

**Tierexperimentelle Untersuchungen zur  
Physiologie und Pathophysiologie des  
Kallikrein-Kinin-Systems bei der Wundheilung  
und im irreversiblen Schock**

**Annemarie Berkenheier**

**1974**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554606\\_0030](https://archive.org/details/IA41554606_0030)



Aus dem Institut für Biochemie und Klinische Chemie an der  
Chirurgischen Klinik der Universität München  
Direktor: Professor Dr.Dr.E.Werle

---

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Physiologie und Patho-  
physiologie des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Wundheilung  
und im irreversiblen Schock

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Annemarie Berkenheier

München  
1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.1974



Herrn Prof.Dr.Dr.E.Werle möchte ich für die Überlassung  
des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes  
meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Dr.Gerhard Engler danke ich sehr herzlich für die  
freundliche Unterstützung und die jederzeit bereitwillig  
gewährten Ratschläge.



## Inhaltsverzeichnis:

|     |                                                       |    |
|-----|-------------------------------------------------------|----|
| A : | <u>Vorkommen und Bedeutung von Kallikrein</u>         | 1  |
|     | <u>I. Geschichte der Kallikreinentdeckung:</u>        | 1  |
|     | <u>II. Kallikrein und seine enzymatische Wirkung:</u> | 1  |
|     | Charakteristik als Enzym                              | 2  |
|     | Aktivierungsmechanismen                               | 4  |
|     | <u>III. Kininwirkungen:</u>                           | 4  |
| B : | <u>Der Wundheilungsprozess</u>                        | 7  |
|     | <u>I. Die Wundheilungsphasen:</u>                     | 7  |
|     | Entzündungsphase                                      | 7  |
|     | Proliferationsphase                                   | 8  |
|     | Organisationsphase                                    | 9  |
|     | <u>II. Wundheilung und Kallikreineinfluß:</u>         | 10 |
| C : | <u>Verbrennungskrankheit und Schockgeschehen</u>      | 11 |
|     | Bisherige Untersuchungen zum Verbrennungsschock       | 11 |
|     | <u>I. Lokale Gewebsschädigung:</u>                    | 12 |
|     | <u>II. Beeinflussung des Gesamtorganismus:</u>        | 13 |
|     | Fragestellung des experimentellen Teils               | 16 |
| D : | <u>Wirkung von Kallikreingabe bei der Wundheilung</u> | 17 |
|     | <u>I. Das Wundsetzungsmodell durch Verbrühung:</u>    | 17 |
|     | <u>II. Das Versuchstier:</u>                          | 17 |
|     | <u>III. Technik des Verbrühungsvorganges:</u>         | 18 |
|     | <u>IV. Versuchsablauf</u>                             | 20 |
|     | <u>V. Ergebnisse:</u>                                 | 21 |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| E : <u>Wirkung von Kallikreingabe im Verbrühungsschock</u> | 26 |
| I. <u>Das Verbrühungsschockmodell:</u>                     | 26 |
| II. <u>Das Versuchstier:</u>                               | 27 |
| III. <u>Technik des Verbrühungsvorganges:</u>              | 27 |
| IV. <u>Ergebnisse:</u>                                     | 30 |
| F : <u>Diskussion der Ergebnisse beider Versuchsreihen</u> | 40 |
| G : <u>Zusammenfassung</u>                                 | 43 |
| Literaturverzeichnis                                       | 45 |

A : Vorkommen und Bedeutung von Kallikrein

I. Geschichte der Kallikreinentdeckung :

1925 entdeckte E.K.Frey bei Untersuchungen zur postoperativen Reflexanurie, daß intravenös injizierter Menschenurin den Blutdruck des Hundes senkt. In Zusammenarbeit mit Willstätter wurde die hochmolekulare, thermolabile Substanz isoliert und zunächst nach Frey F-Substanz genannt. Man dachte zuerst, daß die F-Substanz ein Hormon sei (1,2), und suchte nach der hormonproduzierenden Drüse. Im Arbeitskreis von Frey, Kraut und Werle wurden große Mengen dieser Substanz in Pankreasextrakten von Mensch, Schwein und Rind gefunden, sodaß das Pankreas als Ursprungsort der Kallikreine angenommen wurde (3).

Werle fand weiter, daß Kallikrein im Pankreassaft ausgeschieden wird und größtenteils als inaktive Vorstufe vorliegt, die durch Trypsin (4,5) aktiviert werden kann. In intensiver Forschungsarbeit entdeckte Werle, daß Kallikreine auch in Speicheldrüsen (6), der Niere (7) und im Intestinum (8) gebildet werden. Diese Untersuchungen wurden von Erdös (9) und Zeitlin (10) bestätigt und erweitert. Darüberhinaus fand man in den Samenrüsen des Meerschweinchens (11) und in den Akrosomen der menschlichen Spermatozyten (12) Enzyme, die kallikreinähnlich sind.

II. Kallikrein und seine enzymatische Wirkung :

Kallikrein gehört zur Gruppe der Peptidylpeptid-Hydrolasen, zeichnet sich aber im Gegensatz zu den meisten Enzymen dieser Klasse durch eine hohe Substratspezifität aus.

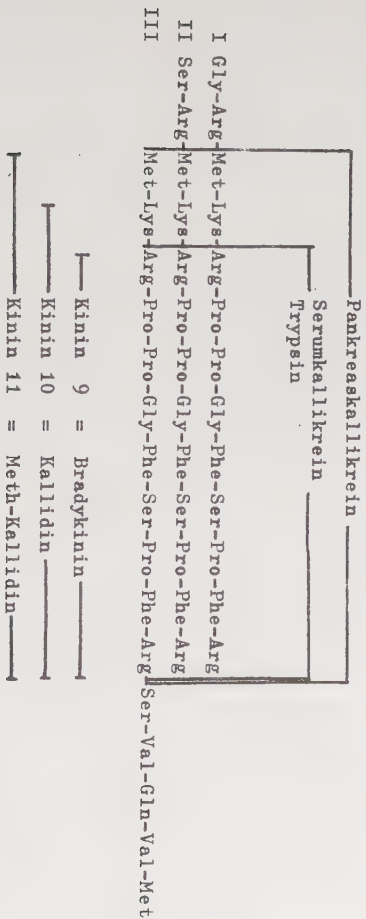
Es setzt durch Spaltung zweier Peptidbindungen aus dem in der Serumglobulinfraction vorkommenden und als Kininogen bezeichneten Glykoproteid die pharmakologisch äußerst aktiven Kinine frei (13).

Die Kallikreine aus Harn, Speicheldrüsen und Pankreas lassen sich als weitgehend reine Enzympräparate isolieren (14) und können als Isoenzyme bezeichnet werden, da das Dekapeptid Kallidin ihr gemeinsames Reaktionsprodukt darstellt (15,16). Das Serumkallikrein, das bisher nur in angereicherter Form isoliert werden konnte und auch wenig stabil ist, setzt aus Kininogen, wie auch das Enzym Trypsin, das Nonapeptid Bradykinin frei.

Alle Kallikreine besitzen zudem noch eine esterolytische Aktivität, die sich vorwiegend gegen die Ester des Arginins richtet und der kininbildenden Aktivität parallel geht (17).

Speicheldrüsenkallikrein liegt in aktivem Zustand in Zellorganellen gespeichert (18), Pankreaskallikrein ist ebenfalls in Zellgranula gespeichert zusammen mit anderen Präenzymen, ähnlich dem Prätrypsin, und wird durch diese Fermente aus dem inaktiven Präkallikrein in das aktive Kallikrein umgewandelt. Die Plasmakallikreinaktivierung beginnt mit der Aktivierung des Hagemanfaktors (19). Der Hagemanfaktor selbst zirkuliert im Plasma in inaktiver Form und wird aktiviert durch Kontakt mit fremder Oberfläche, Wunden u.ä. Der aktive Hagemanfaktor aktiviert Präkallikrein zu Plasma-Kallikrein, das dann Bradykinin freisetzt. Der aktive Hagemanfaktor und Hagemanfaktorfragmente aktivieren außerdem Plasmathromboplastinvorstufen und das aktivierte Thromboplastin führt zur Blutgerinn-

Schema 1 : Teile des Kininogenmoleküls aus denen Kallidin freigesetzt wird ;  
 und Struktur der einzelnen Kinine (nach:K.Hochstrasser,E.Werle u.E.Habermann)



nung. Außerdem bewirkt der Hagemanfaktor eine Umwandlung von Plasminogenvoraktivator in Plasminaktivator, der dann aus Plasminogen Plasmin freisetzt. Plasmin seinerseits hydrolysiert außer Fibrin auch den Hagemanfaktor in Fragmente, die aus Präkallikrein Kallikrein freisetzen und dabei noch wirksamer in der Kallikreinaktivierung sind als der Hagemanfaktor selbst (20).

### III. Kininwirkungen :

Im Prinzip bestehen keine grundlegenden Unterschiede zwischen Kallikrein und Kininwirkung. Kallikrein wirkt nicht direkt, sondern nur über die Freisetzung von Kininen, die dann wirksam werden. Im Gegensatz zu den Kininen kommt Kallikrein in den verschiedenen Geweben in aktiver Form vor; im Pankreas in 10 %, in den Speicheldrüsen sogar zu 100% (21).

Alle Organkallikreine scheinen dabei aus Kininogen Kallidin freizusetzen, während Serumkallikrein Bradykinin freisetzt. Rocha e Silva (22) fand erst kürzlich, daß die Kininwirkung von der Länge der Aminosäurenkette abhängig ist: Je mehr die Peptidkette über das freie Bradykininaminoende hinaus verlängert ist, umso aktiver ist das Kinin, was seine permeabilitätsteigernde Wirkung betrifft und umso weniger blutdruckaktiv.

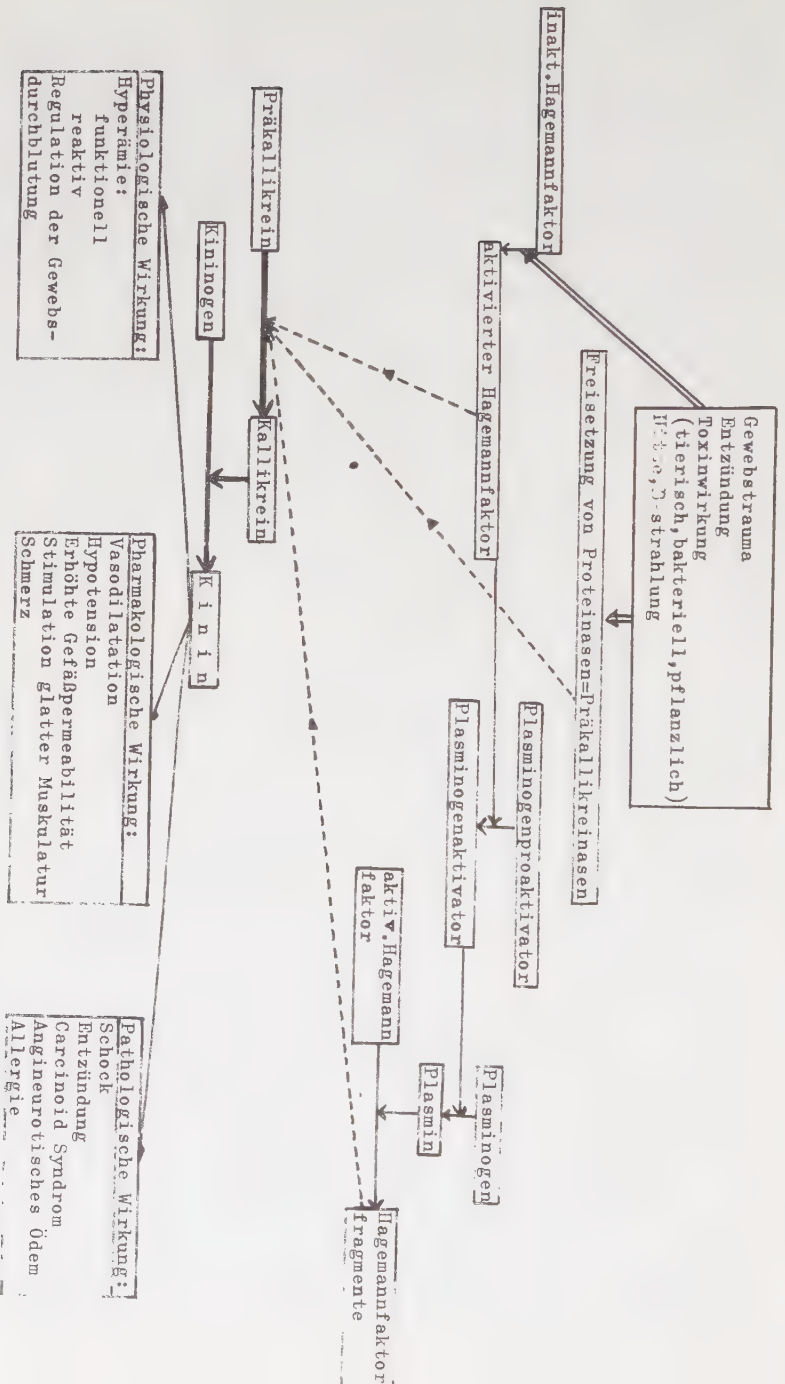
Die Hauptwirkung der Kinine beruht auf direktem Angriff an glatter Muskulatur von Gefäßen und Organen. An Gefäßen tritt eine Vasodilatation ein. Sie bewirkt eine Steigerung der Organdurchblutung. Bei Messungen an Gehirnhäuten erwiesen sich Kinine als potenteste Vasodilatoren (23). Die Kinine wirken direkt auf die peripheren Arteriolen und verursachen Dilatation und Hypotension und wirken indirekt auf das Herz im Sinne einer Vergrößerung des Herz-

zeitvolumens (24). Im Gegensatz zu der Wirkung bei Versuchen in vitro an isolierter Gefäßmuskulatur, bei denen divergierende Wirkungen gefunden wurden (25,26,27,28,29), bestehen übereinstimmende Beobachtungen über die Hautdurchblutung: es kommt durch Kallikreinapplikation zu einer Hautmehrdurchblutung. Mikroskopische Untersuchungen am Kaninchenohr zeigten eine Dilatation der Arteriolen und Kapillaren. Die kontrahierende Wirkung einer i. v. Adrenalin-gabe wird durch eine unmittelbar folgende Kallikreininjektion aufgehoben (30,31). Durch die Mehrdurchblutung der Haut wird auch die Hauttemperatur erhöht. Kallikreininjektionen, die bei Hauttransplantationen in die Transplantatbasis cyanotischer Transplantate appliziert wurden, führten zu einer deutlichen Verbesserung der Durchblutung des Transplantats (32,33).

Als pathologische Reaktion bei Störung des biologischen Gleichgewichtes durch Entzündungsreize kommt es zu Blutdruckabfall und den auf der Gefäßerweiterung beruhenden Entzündungserscheinungen, die außerdem durch Steigerung der Venen- und Kapillarpermeabilität in Form einer morphologischen Auflockerung der Kittleisten des Gefäßendothels (34) verstärkt werden. Eine Potenzierung des Schwartzmann-Phänomens, die Verstärkung des Endotoxinschocks und der Schock bei Pankreatitis werden z.T. der blutdrucksenkenden Wirkung der Kinine bei Ausfall der Steuerungsmechanismen zugeschrieben.

An Uterus (35), Magen, Darm (36) und Bronchien wirken Kinine kontrahierend.

Im Nervensystem stimuliert Kinin zentral parasymphatische Zentren (37), indem es Acetylcholin freisetzt, peripher wirkt es als nicht nikotinartiges, ganglienstimulierendes Agens. Intravenöse Bradykininapplikation führt zu einer Leukocytose (38).



Schema 2 : Entstehung und Wirkung der Kinine

B : Der Wundheilungsprozess

I. Die Wundheilungsphasen :

Beim Wundheilungsverlauf unterscheiden wir katabole und anabole Vorgänge. Beide Vorgänge starten sofort nach Wundsetzung und verlaufen mit wechselnder Intensität parallel zueinander, bis das durch die Wundsetzung gestörte Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau im betroffenen Bindegewebe weitgehend normalisiert worden ist.

Entzündungsphase : Permeation und Exsudation sind die beiden Initialvorgänge nach Wundsetzung. Sie führen zum entzündlichen Ödem und werden durch die Gewebsazidose und die Freisetzung vasoaktiver Substanzen im Wundgebiet fortlaufend gesteigert. Die Gewebsazidose gehört zu den unmittelbaren Wundsetzungsfolgen. Sie ist bereits wenige Minuten nach Wundsetzung feststellbar. Ihre primäre Ursache ist eine Peristase und intravasale Stase, die zu lokalem Sauerstoffmangel und zur Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Gewebe führt. Durch den Sauerstoffmangel kommt es weiter zur anaeroben Glykolyse mit Anreicherung fixer Säuren und damit zur Verstärkung der Gewebsazidose. Neben der gewebsazidosebedingten Anreicherung organischer Säuren haben weiter nach Wundsetzung freiwerdende Substanzen Einfluß auf die Gefäßreaktionen; neben den biogenen Aminen spielen vor allem die Polypeptide Bradykinin und Kallidin durch die vasodilatative Wirkung eine entscheidende Rolle.

Durch die folgende Säure-Basen-Gleichgewichtsstörung wird das Bindegewebe in seiner Eukolloidalität gestört. Der Zwischen-

substanzaabbau wird zunehmend gefördert. Somit gelangen im Wundgebiet Exsudation, Gerinnung, Emigration kernhaltiger Elemente - in der akuten posttraumatischen Phase vorwiegend Granulozyten, in den folgenden Phasen überwiegend mononukleäre Rundzellen -, Azidose, Ischämie, Nekrose und Katabolismus in kürzester Zeit zu ihrem Höhepunkt. Der entzündliche Bindegewebsabbau startet primär extrazellulär durch die im posttraumatischen Entzündungsbeginn beginnende Freisetzung primärer Lysosomen. Der extrazelluläre Katabolismus beginnt mit kolloidchemischen Veränderungen der Grundsubstanz mit folgender Desaggregation, Teilchenzerkleinerung und Depolymerisierung. Es kommt zum primär extrazellulären, enzymatischen Kollagenabbau im Wundgebiet. Die Grundvorgänge der Pino-, Phago-, bzw. Endozytose in Mikro- und Makrophagen sind bei posttraumatischen, wie bei anderen Entzündungsvorgängen nachweisbar. Sie führen zur intrazellulären Fortsetzung des Abbaues gewebeeigenen und -fremden Materials des Wundfeldes.

Proliferationsphase : Dem Austritt von Blutflüssigkeit und Erythrozyten folgt der Austritt kernhaltiger Elemente. Während die hämatogene Abstammung der Granulozyten des Wundfeldes klar ist, nimmt man an, daß der größte Teil der Makrophagen von hämatogenen Monozyten bzw. von lymphmonozytären, mononukleären Rundzellen, von denen auch die Histozyten herkommen, abstammt, welche im Wundgebiet zu Makrophagen werden, ebenso wie perikapilläre Perizyten.

Bei der weiteren Transformation und Differenzierung in Makrophagen und Fibroblasten ist die Unterscheidung von primär histiogenen Zellen gleicher Struktur und Funktion schwer möglich. Auch lymphoide Elemente können multipotente Transformations- und Differenzierungsfähigkeiten in die einzelnen Zellformen des Wundgranulationsgewebes besitzen, einschließlich der Perizyten und Adventitiazellen.

Die Grundsubstanzsynthese ist bereits innerhalb der ersten Stunde nach Wundsetzung durch ortsständige Fibroblasten des Wundfeldes gegenüber der Ausgangslage erhöht (39,40,41). Durchschnittlich zwei Tage nach der Wundsetzung kommt es zu einer schnellen Fibroblastenbildung. Diese für die Wundheilung wichtigsten Zellen dienen der Kollagen- und Grundsubstanzbildung. Sie entwickeln sich aus den wenigen ortsständigen Fibrozyten, im übrigen aber aus den weißen Blutzellen. Die Mitoserate steigt im Wundrandgebiet durch Verlust eines Mitosehemmstoffes bis auf das 12-fache an (42).

Der weitere Verlauf der Wundheilung ist ab diesem Zeitpunkt an eine ungestörte Biosynthese der DNS gebunden. Für den geregelten und ökonomischen Ablauf der Proteinsynthese sorgt ein kompliziertes Steuersystem. Zur Kollagensynthese ist es z.B. notwendig, daß die Aminosäuren für diese Synthese aktiviert werden.

Die Grundsubstanzbildung geht der Faserbildung voraus, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen konnten (43). Es ist möglich, daß das Leitungsmuster der Grundsubstanzpolysaccharide der zu bildenden Kollagenphase matritzenartig die Struktur vorgibt (44), und so die Faserbildung reguliert.

Organisationsphase: Nach dem 12.-14. Tag kommt es zu einer Reifung des Bindegewebes. Die Kollagenstrukturen bilden sich von der Polypeptidschraube zu Dreierschraubenbündeln - von der Sekundärstruktur zur Tertiärstruktur - um und durch weitere Reifung in die Quartärstruktur der Kollagenfibrillen. Dieser Differenzierungsvorgang ist sehr stör anfällig (45). Wundfestigkeit, Dehnungsstärke und Zerreißbarkeit sind im wesentlichen von dem Kollagengehalt der Wunde abhängig und gehen dessen Zunahme zeitlich parallel.

Es folgt dann später nach dem 16. Tag durch Wasserverlust eine

leichte Schrumpfung des Bindegewebes, auch die Durchblutung wird allmählich wieder geringer. Die Zahl der Fibroblasten nimmt ab und die Kollagenfibrillen nehmen zu. Diese Differenzierungsphase führt zu Stabilität und Konsolidierung der Narbe.

## II. Wundheilung und Kallikreineinfluß :

In der Entzündungsphase kommt es durch die Kininfreisetzung zu einer Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität.

In der Proliferationsphase ist das Kallikreinsystem teilweise verantwortlich für den Beginn der Gewebsregeneration, da Kallikrein und Kinin eine mitogene Wirkung bei Säugetiergewebe haben, wie erst kürzlich im Arbeitskreis von Rixon und Whitfield beobachtet wurde. Sie fanden, daß Bradykinin eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Thymuslymphoblasten in einem kalziumhaltigen Medium hat. Auch in Abwesenheit von Kalzium bereitet Kinin eine Mitosestimulation vor, die dann durch Kalziumzugabe abläuft (46,47).

Die Injektion von Pankreaskallikrein bei Ratten verursachte eine deutliche Stimulation der DNS-Synthese im Knochenmarkgewebe und im Thymusgewebe. Massart u.a. untersuchten als erste, daß Kallikrein die Wundheilung nach Bestrahlungswundsetzung beschleunigt : starke Radiodermatitiden, verursacht durch Bestrahlung von Ratten mit Hautoberflächendosen von 70000 r, konnten durch Kallikreinapplikation innerhalb 6 Wochen abgeheilt werden (48,49). Mandel und Rodesch machten noch ausführlichere Untersuchungen über die Kallikreinvirkung bei Bestrahlungswundsetzung bei mehreren Tierarten. Sie stellten eindeutig fest, daß Kallikrein einen günstigen Effekt auf die Überlebenschance nach Bestrahlung und auf die Wundheilung nach Radiodermatitis bei lokaler Bestrahlung hat. Kallikrein hat außerdem einen regenerationsfördernden Effekt auf das Knochenmark (50,51)

**C : Verbrennungskrankheit und Schockgeschehen :**

Wesentliche Fortschritte in der Therapie von Verbrennungsverletzungen wurden erzielt, als man erkannte, daß die Hautverbrennung nicht nur eine örtliche Schädigung verursacht, sondern den Gesamtkörper beeinflußt. Der Begriff der Verbrennungskrankheit wurde geprägt (52,53).

Bisher wurde der Ablauf der Verbrennungskrankheit in verschiedene Stadien unterteilt: in das Schock-, das Intoxikations- und das Infektionsstadium. Auf Grund neuerer pathophysiologischer Erfahrungen spricht Artursson vom burn-syndrom, das hauptsächlich durch die Änderung des Wasserhaushaltes charakterisiert ist. Er teilt das Verbrennungssyndrom in 3 Phasen ein: in der ersten Phase führen die geschädigten Gefäße und die erhöhte Kapillarpermeabilität zur akuten zirkulatorischen Insuffizienz. Der gesamte Körper ist in der Regulierung der Vasomotorik betroffen. Zahlreiche Organe erscheinen gestaut, ödematös und mit multiplen Hämorrhagien durchsetzt. Hirn- und Lungenödem, Nierenrindennekrosen mit Oligo- bzw. Anurie, Darmlähmung, Leberschäden, Myokardinsuffizienz können sich einstellen; in einer zweiten Phase vom 3. - 8. Tag nach Wundsetzung kann es durch die veränderte Blutflüssigkeitszusammensetzung, den Gesamtkörperproteinverlust und die Elektrolytstoffwechselstörungen zu degenerativen Veränderungen in den Organen kommen; in einer dritten Phase kann sich im Anschluß daran eine Atrophie der betroffenen Organe mit fibrotischer RepARATION auf dem Hintergrund genereller Stoffwechselentgleisung, Infektion und Kachexie entwickeln (54).

### I. Lokale Gewebsschädigung :

Die Verbrennungswunde zeigt die klassischen Zeichen einer Entzündung: Calor, Rubor, Tumor, Dolor und Functio laesa, die Reaktionen des Körpers um nekrotisch gewordenes Gewebe abzubauen - aber auch direkter Ausdruck einer Schädigung der Nervenendigungen, Hautanhangsgebilde und der Hautgefäße. Ein wichtiger Faktor der Entzündungsreaktion nach einer Verbrennung ist die abnorme Kapillarpermeabilität. Histamin und Serotonin sind entscheidend am Beginn der Exsudation beteiligt; schon 10 min. nach Wundsetzung steigt der Histamingehalt meßbar an und erreicht nach einer Stunde das 10-12 fache der Norm (55). Nach drei Stunden ist der Plasmahistaminspiegel wieder auf Normalwerte abgefallen.

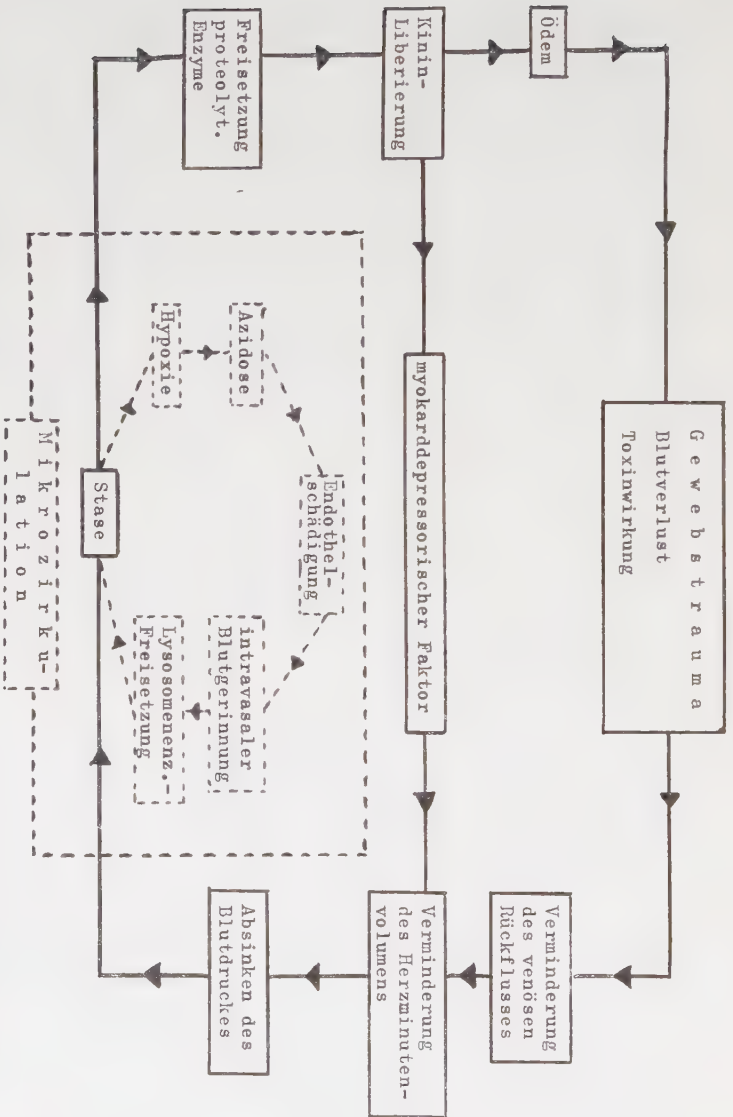
Kinine bewirken in einer zweiten Phase eine längerandauernde Permeabilitätserhöhung. Rocha e Silva wies eine Kininerhöhung im Serum bei thermisch verursachtem Rattenpfotenödem nach (56). Weitere Arbeiten (57,58,59) bestätigten dies. Artursson konnte zeigen, daß es nach Verbrühungen zu einem starken Anstieg des Lymphflusses kommt und daß die Gefäßpermeabilität und das Wundödem ein bis drei Stunden nach dem Trauma am stärksten sind. Jüngste Arbeiten weisen nach (60), daß es in der Kininfreisetzungsphase außerdem zu einer Freisetzung von Prostaglandinen kommt. Auf Grund bisheriger Untersuchungen nimmt man an, daß die Kinine die Prostaglandine freisetzen könnten, da durch bestimmte Prostaglandine Schmerz, Vasodilatation, Kapillarpermeabilitätserhöhung und Kontraktion glatter Muskulatur verursacht werden. Viele Aktivierungsmechanismen führen beim thermisch verursachten Trauma zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems (s.Schema 2).

Die Hitze führt zu einer Gewebsnekrose im unmittelbaren Wundbezirk; sie verursacht eine Koagulation von Eiweiß, Zellen werden denaturiert, Zellorganellen entlassen Enzyme durch Zerstörung der Grenzmembranen. Regulationsgleichgewichte werden gestört, Enzyminaktivierungssysteme sind blockiert, freigesetzte proteolytische Fermente, wie Trypsin, Plasmin und Kathepsine können ungehindert ihre Wirkung entfalten: aus Präkallikreinen wird Kallikrein freigesetzt, welches weiter aus Kininogen Kinin liberiert. Präkallikreine können neben den proteolytischen Enzymen auch noch durch den aktivierten Hagemannfaktor oder durch die von Plasmin entstehenden Hagemannfaktorfragmente zu Kallikrein aktiviert werden.

Eine Potenzierung der Kininwirkungen ist durch die Gewebsazidose gegeben: die Aktivität der Kininasen ist in leicht saurem Milieu stark herabgesetzt, wohingegen die Kininogenasenaktivität unverändert bleibt (61). Zudem können freiwerdende Peptidfragmente die Wirkung der Kinine potenzieren (62).

## II. Beeinflussung des Gesamtorganismus :

Solange die freiwerdenden proteolytischen Fermente gehemmt werden, sobald sie in den großen Körperkreislauf kommen, bleibt das Wundgeschehen ohne Folgen für den Gesamtkörper. Werden jedoch die körpereigenen Inhibitorsysteme aufgebraucht:  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Inter- $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, kann der Gesamtkörper vor den proteolytischen Aktivitäten nicht mehr geschützt werden. Es kommt zum Schock. Dieser ist bei der Verbrennungskrankheit durch eine ausgeprägte Flüssigkeitsverschiebung gekennzeichnet, sowie eine starke Aktivierung des Gerinnungssystems.



Schema 3 : Hämodynamische und mikrozirkulatorische Ereignisse im Schockgeschehen (n.Mission)

Die Faktoren, die verantwortlich sind für den 'sogenannten irreversiblen Schock' wurden intensiv untersucht und es wurde eine Reihe von Theorien aufgestellt, die zu erklären versuchen, warum Volumenersatz, Beseitigung des peripheren Widerstandes und Ausgleich der Azidose oft bei Patienten im irreversiblen Schock keinen Erfolg mehr haben (63, 64, 65).

Es erscheint unwahrscheinlich, daß ein einzelnen Faktor in der Pathophysiologie des Schockgeschehens allein verantwortlich ist für die Irreversibilität des Geschehens. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß das Versagen der Mikrozirkulation - charakterisiert durch die intravasale Koagulationsbereitschaft des Blutes und die Störung in der Regulation der Kapillarpermeabilität und Kapillarvasomotorik - eine entscheidende Rolle im irreversiblen Schock spielt.

Außerdem wird in neuerer Zeit immer mehr ein 'myocard depressing factor' mitverantwortlich gemacht für den irreversiblen Schockzustand (66). Proteolytische Enzyme, die in Folge der Gewebsschädigung freigesetzt werden, üben dabei teils direkt, teils indirekt durch Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems einen schädigenden Effekt auf die Mikrozirkulation aus (67, 68, 69, 70). Sie werden auch verantwortlich gemacht für den myokarddepressorischen Effekt (71, 72, 73). (siehe Schema 3)

Kallikrein hat durch die Freisetzung von Kininen physiologisch die Aufgabe, funktionell und reaktiv eine Gewebshyperämie zu bewirken und somit die Gewebsdurchblutung mit zu steuern.

Der Abtransport von Stoffwechselmetaboliten und die Sauerstoffversorgung können durch diesen Regulationsmechanismus beeinflusst werden.

Wird allerdings Kinin unkontrolliert freigesetzt, wie das beim irreversiblen Schock diskutiert wird, so soll die Kininwirkung mitentscheidend sein am letalen Ausgang des Schocks.

Um in diesem Zusammenhang die physiologischen Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems zu untersuchen, wendeten wir Kallikrein nach Wundsetzung durch Verbrennung an. Es sollte dabei geprüft werden, ob und in welchem Maße Kallikrein die Wundheilung fördern kann.

Um die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems im Schock weiter zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe Kallikrein nach Hitzeschock appliziert.

Die Ergebnisse sind im folgenden Teil beschrieben.

## C : Wirkung von Kallikrein-gabe bei der Wundheilung

### I. Das Wundsetzungsmodell durch Verbrühung :

Verschiedene Wundsetzungsmethoden sind beschrieben. Wunden können durch Excision eines bestimmten Hautareals durch re-ttierendes Ringmesser erzeugt werden (74a) oder durch Be-strahlung können Radiodermatitiden verursacht werden oder durch Verbrennung.

Um den Heilungsverlauf bei Brandwunden vergleichen zu kön-nen, müssen folgende Bedingungen der Wundsetzung erfüllt werden:

1. Die Wundfläche muß exakt reproduzierbar sein.
2. Die Wundtiefe soll nicht variieren.
3. Die Wahrscheinlichkeit einer Sekundärheilung soll möglichst herabgesetzt sein.

Diese Forderungen an das Wundsetzungsmodell erfüllt die von Arturson und Schild angegebene Methode am besten. Das Ver-suchstier wird dabei in der Verbrühungsapparatur so gela-gert, daß der Rücken der Ratte in eine Aussparung zu liegen kommt, die den Kontakt des heißen Wassers mit dem Rücken der Ratte in einem flächenmäßig definierten Bezirk ermöglicht.

### II. Das Versuchstier :

Bei allen Versuchen wurden Sprague-Dawley-Ratten vom gleichen Stamm verwandt. Die Tiere wurden eine Woche vor Versuchsbe-ginn in Sammelkäfige in den Versuchsraum gebracht, um sich

adaptieren zu können. Bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten sie Altromin-Standardfutter und Wasser ad libidum. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden 30 Versuchstiere mit einem Gewicht von  $170 \pm 5$  Gramm aussortiert.

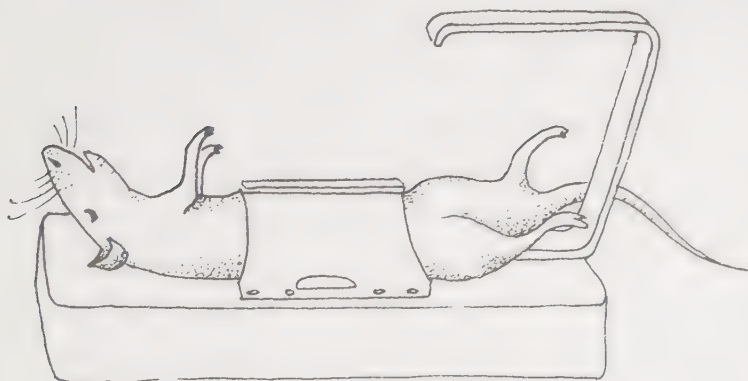
### III. Technik des Verbrühvorganges :

45 min. vor dem Verbrühvorgang werden die Tiere mit 1ml/100gKG 3,6%igem Chloralhydrat, welches intraperitoneal injiziert wird, anästhesiert. In betäubtem Zustand werden die Tiere am Rücken in dem Bezirk, der verbrüht werden wird, geschoren. Anschließend werden sie im geschorenen Bezirk mit dem Enthaarungsmittel Pilca<sup>R</sup> enthaart. Um ein Auskühlen der Tiere in diesem Zustand zu vermeiden, werden sie mit einer Heizsonne bis zum Versuchsbeginn gewärmt. Die Verbrühung des Rückens der Ratte wird bei konstanter Temperatur von  $93^{\circ}$  in einem thermostatisch regelbaren Wasserbad (Lauda Thermostat) vorgenommen. Dem Wasser werden noch Detergentien zugesetzt, um durch gleichmäßige Benetzung der Haut Luftblasenbildung im feinen Haarpolster zu vermeiden, die wie eine Isolierschicht wirkt.

Zur Erzielung einer standardisierten Verbrühung führten wir die von Arturson und Schildt angegebene Methode durch (80a). Die wannenförmige Vertiefung in der Verbrühungsapparatur wurde dem Rücken der Ratte anmodelliert, nach einem Ausgußmodell, das durch Fixation einer toten Ratte in Kyphose-Haltung in Wachs angefertigt wurde. Die Fläche der Aussparung, die der Kontaktfläche mit dem Wasser entspricht, wurde so gewählt, daß ca. 8,5 % der Körperoberfläche der 170 g schweren Ratten verbrüht wurden. Nach dem WachsmodeLL wurde eine Kunststoffform aus nicht wärmeleitendem Polystyrol gegossen.

Die betäubten Tiere werden so in den Plastikblock gelegt, daß der geschorene Bezirk am Rücken in kyphotischer Haltung leicht in die ausgespaarte Öffnung gedrückt werden kann. Eine Abdichtung der Blocköffnung, um zu vermeiden, daß durch einfließendes Wasser mehr an Hautareal verbrannt wird, als gewünscht wird, wird einmal durch Einsäumung der Blockaussparung mit einem Dichtgummi-band und zum anderen durch exakte Fixierung der Ratte im Block mit einem breiten Gummiband, welches oben am Block über den Körper der Ratte gespannt wird und neben der Fixation einen gleichmäßigen Druck ausübt. Sind die Tiere im Block gelagert und fixiert, wird der Plastikblock 20 sec. in das 93<sup>0</sup> heiße Wasser getaucht, sodaß das ausgespaarte Areal am Rücken der Ratte verbrüht wird. Es wird darauf geachtet, daß das heiße Wasser keine weiteren Körperteile benetzen kann. Nach der Verbrühung werden die Tiere sorgfältig mit Zellstoff abgetrocknet und in durchsichtige Makrolon-Einzelkäfige gebracht, die eine übersichtliche Kontrolle der Tiere ermöglichen.

Abb.1 Skizze der Verbrühungsapparatur



#### IV. Versuchsablauf :

Die Tiere wurden täglich beobachtet. Insgesamt nahmen wir je 15 Tiere für die Vergleichsgruppe und die Kallikreingruppe. Bei der Kallikreingruppe injizierten wir erstmals am 1.Tag nach Verbrühungswundsetzung 5 BU intramuskulär und setzten die Injektionen von täglich 5 BU intramuskulär über weitere 6 Wochen fort. Wir gingen dabei von folgender Überlegung aus: Bei Gewebsstraumatisierung verursachen die durch Kallikrein freigesetzten Kinine nicht nur Schmerz und eine nützliche Vasodilatation sondern regen auch die Zellproliferation an, wie Rixon und Whitfield eindeutig nachwiesen. Das Kallikreinsystem spielt möglicherweise bei der Wundheilung als lokales Kontrollsystem eine entscheidende Rolle. Untersuchungen von Rixon und Whitfield an Thymuslymphblasten und Knochenmarkszellen nach Gabe von Kallikrein, zeigten daß durch Gaben von 1-10 BU Kallikrein/Ratte bereits bei 1 BU/Tier die Knochenmarksmitoserate deutlich anstieg und bei 4,5 BU das Maximum erreichte, das auch nach höheren Gaben von Kallikrein nicht mehr überschritten wurde. Mandel und Rodesch applizierten bei Wundheilungs- und Überlebensversuchen nach Röntgenbestrahlung an Ratten 5 BU/Tier. In Anbetracht obiger Untersuchungen wählten wir deshalb auch eine Dosis von 5 BU Kallikrein( Padutin<sup>R</sup> ).

Bei der Vergleichsgruppe starben 4 Tiere innerhalb der ersten 48 Stunden nach Wundsetzung, von der Kallikreingruppe 2 Tiere. Die übrigen Tiere wurden weiterhin täglich zweimal kontrolliert. Die Wundflächen wurden in den ersten beiden Wochen 2x planimetrisch ausgemessen, in den weiteren drei Wochen 1x /Woche. Photographisch wurde der Wundheilungsablauf dokumentiert durch Aufnahmen zu Beginn, der Mitte und gegen Ende des Wundheilungsab-

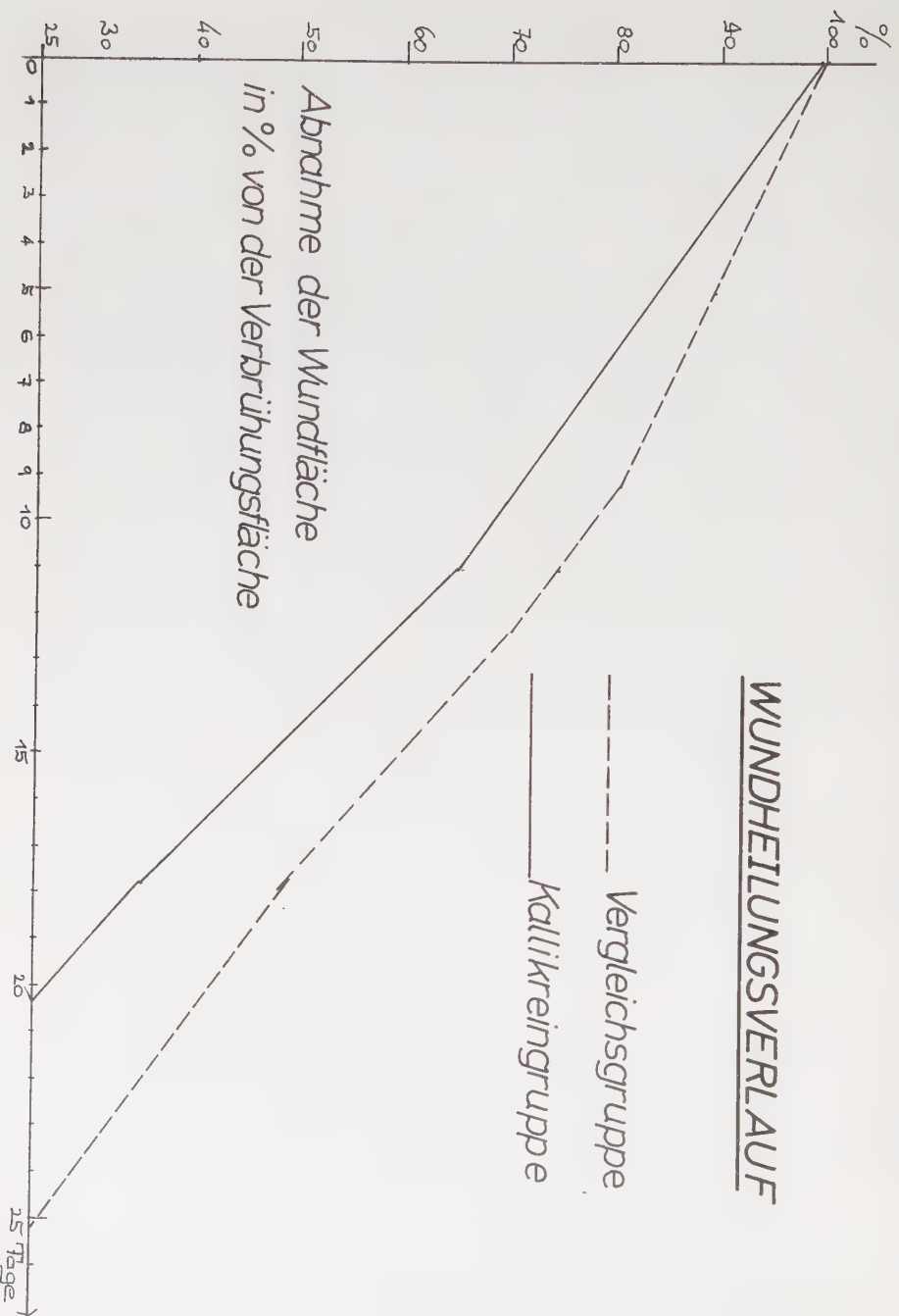
laufes. Die Tiere erhielten während des gesamten Beobachtungszeitraumes Altromin-Standardfutter und Wasser ad libidum.

V. Ergebnisse :

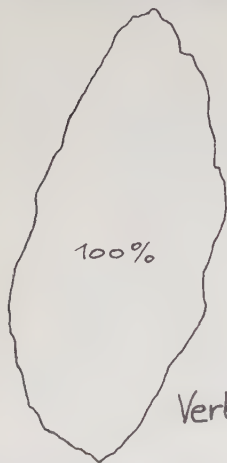
Die planimetrisch erhaltenen Wundflächengrößen der Kallikrein-Gruppe und der Vergleichsgruppe ergaben eine deutliche, stetig zunehmende, schnellere Wundflächenverkleinerung bei der Kallikrein-Gruppe : nach 10 Tagen hatten sich die Wunden bei der Kallikrein-Gruppe im Schnitt auf 65% der Ausgangswundfläche verkleinert im Vergleich zur Leerwert-Gruppe auf 75%; nach 20 Tagen waren die Wunden der Kallikrein-Gruppe im Schnitt auf 26% des Ausgangswertes geheilt, die der Vergleichsgruppe auf 43 %; nach 25 Tagen war bei der Kallikrein-Gruppe die Wundfläche zu einem Narbenstrang retrahiert, bei der Vergleichsgruppe erst nach 31 Tagen. Signifikanzberechnungen nach dem Student-T-Test ergaben, daß die Mittelwerte der beiden Gruppen bei allen planimetrischen Kontrollen signifikant voneinander abwichen.

Die Durchschnittswerte der planimetrischen Ergebnisse sind in der folgenden Kurve 5 dargestellt.

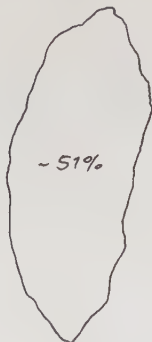
# WUNDHEILUNGSVERLAUF



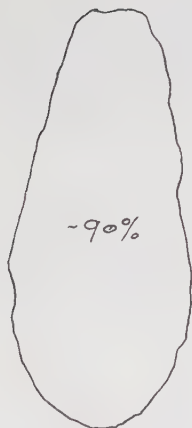
# Beispiel eines Wundverlaufs - Vergleichsgruppe -



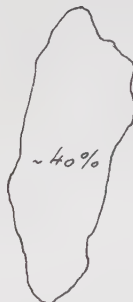
Verbrühungsfläche



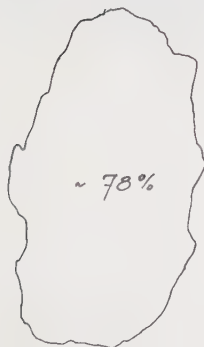
nach 18 Tagen



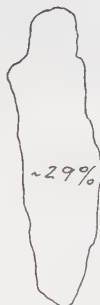
nach 5 Tagen



nach 20 Tagen



nach 11 Tagen

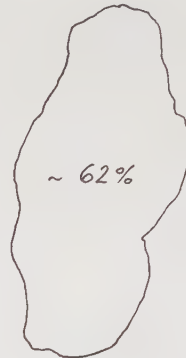


nach 25 Tagen

## Beispiel eines Wundverlaufs mit Kallikrein



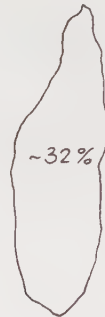
100 %



~ 62 %

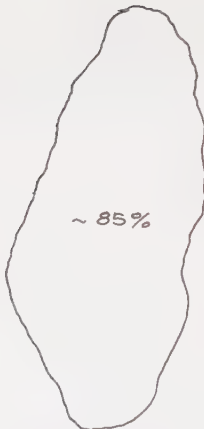
nach 11 Tagen

Verbrühungsfläche



~ 32 %

nach 18 Tagen



~ 85 %

nach 5 Tagen



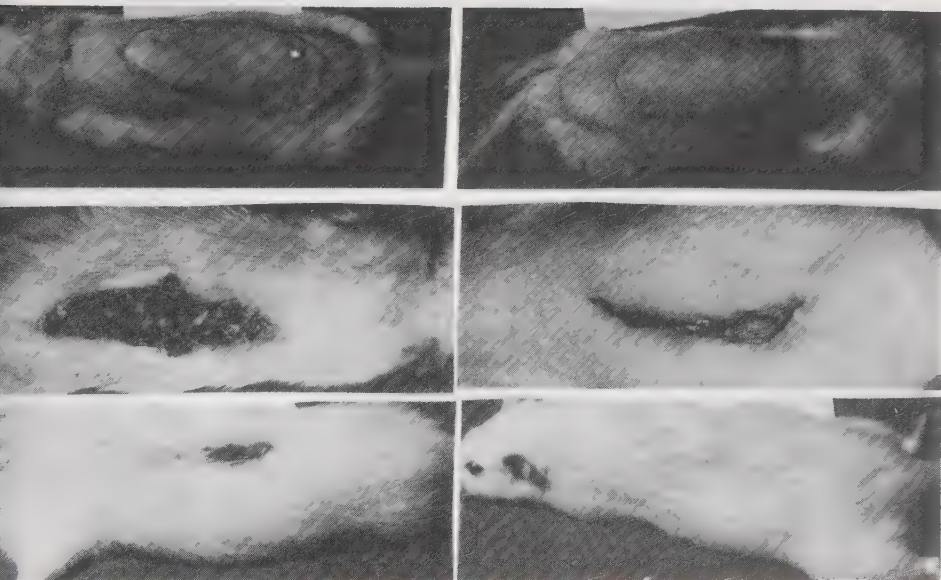
~ 25 %

nach 20 Tagen

Abb. 4 : Photographische Aufzeichnungen über den Wundheilungsverlauf  
der Vergleichsgruppe und der Kallikreingruppe am 1, 20 u. 26.  
Tag nach Gewebstrauma :

Vergleichsgruppe:  $V_6$

Kallikreingruppe:  $K_6$



D : Wirkung von Kallikreingabe im Verbrühungsschock

I. Das Verbrühungsschockmodell :

Verschiedene Schockmodelle wurden bisher beschrieben (74,75,76), Entblutungsschock, Dextranschock, Endotoxinschock, Peritonitisschock und Hitzeschock. Bei allen Schockformen kommt es nach einer gewissen Anlaufzeit zum gleichen Schockablauf mit seinen in Schema 3 beschriebenen Grundmechanismen. Deshalb ist bei der Wahl des Schockmodells von folgenden Gesichtspunkten auszugehen:

1. optimale Reproduzierbarkeit des Schockereignisses
2. einfache, kontrollierbare Versuchsanordnung
3. kurze Dauer des Schockereignisses, um größere Tierreihen zu testen
4. exakte Bestimmung des Versuchsergebnisses.

Unter diesen Gesichtspunkten schien das Hitzeschockmodell am günstigsten zu sein.

Zur Erzielung eines Verbrennungstraumas sind in der Literatur schon verschiedene Modelle beschrieben; Berührung mit einem Brandeisenschild (77), mittels Lichtbogen (78), mit einer Bunsenbrennerflamme (79) und Verbrühung mit heißem Wasser (80,81,82).

Um einen Schock zu erzielen, muß man ausgedehnte Hautflächen verbrühen. Man kann die Tiere dabei einfach in heißes Wasser eintauchen, je nach erwünschtem Verbrühungsausmaß entsprechend tief; viele unerwünschte Reaktionen - Schädigung an Schwanz und Pfoten und den urethralen und analen Orificien mit Nekrosen und

Infektionen - müssen dabei in Kauf genommen werden (83). Durch die direkte Hitzeeinwirkung auf abdominale Organe kann es dabei zu Endotoxinfreisetzung, die einen nicht kontrollierbaren das Schockgeschehen aggravierenden Effekt verursacht, kommen (84).

Besser ist die von Mc Carty entwickelte Methode der 'back-burn-procedure', die von Arthurson weiter verbessert wurde.

Die Extremitäten bleiben bei dieser Methode funktionsfähig und das Tier behält seine Bewegungsfreiheit; auch die Ausscheidungsorgane sind bei dieser Verbrühungsmethode nicht beeinträchtigt. Da die Tiere am Rücken verbrüht werden, bleibt die intraperitoneale oder intravenöse Injektionsmöglichkeit erhalten.

## II. Das Versuchstier :

Bei allen Versuchen wurden Sprague-Dawley-Ratten vom gleichen Stamm verwandt. Sie wurden eine Woche vor Versuchsbeginn in Sammelkäfige in den Versuchsraum gebracht um sich zu adaptieren. Bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten sie Altromin-Standardfutter und Wasser ad libidum. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde die benötigte Anzahl von Tieren mit einem Gewicht von  $200 \pm 5$  Gramm aussortiert. Die Raumtemperatur wurde auf durchschnittlich  $27^{\circ}$  gehalten.

## III. Technik des Verbrühungsvorganges :

45 min. vor dem Verbrühungsvorgang werden die Tiere durch Injektion von 1ml/100g KG 3,6%igem Chloralhydrat anästhesiert. In betäubtem Zustand werden dann die Tiere am Rücken und bis auf einen schmalen Streifen, der am Bauch stehen bleibt, geschoren. Anschließend werden sie im geschorenen Bezirk mit dem Enthaarungsmittel Pilca<sup>R</sup>

enthaart. Um ein Auskühlen der Tiere in diesem Zustand zu vermeiden, werden die Tiere mit einer Heizsonne gewärmt. In Vorversuchen zeigte sich, daß das exakte Enthaaren nach dem Schervorgang für ein genaues Ergebnis erforderlich ist. In dem feinen Haarpolster, das nach einfacher Schur noch bleibt setzen sich Luftblasen beim Verbrühungsvorgang fest, die wie eine Isolierschicht wirken können und eine vollständige Benetzung der Haut mit dem heißen Wasser verhindern. Die gleichmäßige Benetzung der Haut wird durch einen Zusatz von Detergentien zum Wasserbad noch besser erreicht.

Die Verbrühung des Rückens der Ratte wurde bei konstanter Temperatur von  $93^{\circ}\text{C}$  in einem thermostatisch regelbaren Wasserbad vorgenommen. Detergentien wurden zugesetzt; die Ratte wird dabei vorher auf eine gebogene Kramerschiene gespannt, so daß der Kopf hochgebunden ist, der Schwanz zwischen den Hinterfüßen durchgezogen fixiert wird und somit nur der Rücken verbrüht werden kann. So wird erreicht, daß keine Körperöffnung in das Verbrennungsareal mit einbezogen ist. Zur Kontrolle der Eintauchtiefe orientiert man sich an den von Mc Carty angegebenen anatomischen Merkpunkten. Bei dieser Versuchsanordnung kann eine Genauigkeit des verbrühten Areal's von  $38 \pm 3\%$  der Körperoberfläche bei der entsprechenden Versuchsvorrichtung erzielt werden. Die Verbrennungsbezirke wurden planimetrisch kontrolliert und auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Das Verhältnis von verbrühter Fläche zu unverbrühter wurde mit der Formel von Lee berechnet:  $A = K \cdot W^{2/3}$ , ( $A$  = Oberfläche des Tieres in  $\text{cm}^2$ ,  $W$  = Körpergewicht in Gramm,  $K = 10$ ), die die Gesamtoberfläche bestimmen läßt und der Bestimmung der Verbrühungsfläche mittels Planimetrie, festgestellt.

Die Verbrühungszeit wurde mit der Stoppuhr gemessen und betrug je-

weils in den ersten 3 Versuchen 22 sec. und im 4. Versuch 35 sec. Nach der Verbrühung wurden die Tiere in durchsichtige Makrolon-Einzelkäfige gebracht, wo sie genau überwacht werden konnten. Die Tiere bekamen weiterhin Altromin-Standardfutter und Wasser ad libidum. Sie wurden in den ersten 12 Stunden halbstündlich untersucht, was Atmung, Temperatur, Durchblutung der Ohren anbelangt, bis zur 24. Stunde stündlich, danach alle drei Stunden. Die Parameter Überleben zu Nichtüberleben und die Zeitabhängigkeit dazu konnten somit klar bestimmt werden.

Im Tierexperiment hat man mit einer Reihe von verschiedenen Schockmodellen die Hämodynamik, morphologische Veränderungen in der Mikrozirkulation und metabolische Störungen im Ablauf des Schockgeschehens näher verfolgen können (85,86,87).

Einer kurzdauernden Initialphase des Blutdruckabfalls wird durch periphere Vasokonstriktion kompensatorisch begegnet. Bei Fortbestehen der Schockursache fällt in einer zweiten Phase der Blutdruck erneut ab, erholt sich nicht mehr, und die Tiere gehen im irreversiblen Schock zugrunde.

Da das Kallikrein-Kinin-System im irreversiblen Schock eine entscheidende Rolle spielen soll, untersuchten wir in vier Versuchsserien, ob der Zeitpunkt der Kallikreinapplikation einen Einfluß auf die Überlebensrate der Tiere hat. Außerdem wurde überprüft, ob die Menge des verabreichten Kallikreins einen entscheidenden Einfluß hat. Im ersten Versuch wurde deshalb eine einmalige Injektion von 5 BU Kallikrein/Tier 8 Stunden nach Verbrühung appliziert; im zweiten Versuch injizierten wir mehrmals 5 BU/Tier im Abstand von 8,15, 23 und 28 Stunden nach Verbrühung; im dritten Versuch injizierten

wir 5 BU/Tier schon nach 3 Stunden. Im vierten Versuch wurde die Kallikreininjektion von 5 BU/Tier erstmals unmittelbar nach Verbrühung appliziert und zwei weitere Injektionen der gleichen Menge Kallikrein nach 4 und 10 Stunden.

Die Überlebensdauer wurde wie oben beschrieben genau kontrolliert.

#### IV. Ergebnisse :

In den vier Versuchen zeigte sich eindeutig, daß die Tiere, die Kallikrein appliziert erhielten, schneller nach irreversiblen Verbrühungsschock starben als die Kontrollen. Wurde Kallikrein, wie in den ersten drei Versuchen erst nach einigen Stunden injiziert, so war die den Schock beeinflussende und verstärkende Wirkung nicht mehr so stark im Vergleich zur Wirkung, die injiziertes Kallikrein unmittelbar nach Verbrühung hat, wie der letzte Versuch ganz klar zeigte.

In den einzelnen Versuchen wurden folgende Ergebnisse erhalten (siehe auch Graphik 1-4 und Kurve 1-4):

1. Versuch: Anzahl der Tiere: 18, Kontrollgruppe 10, Kallikreingruppe 8 Tiere. Verbrühungsdauer 22 sec. bei 93° C. Nach 25 Stunden leben von der Kallikrein-  
gruppe noch 4 Tiere, von der Vergleichsgruppe 9 Tiere. Statistische Signifikanz nach dem  $\chi^2$ -Test signifikant auf dem 2,5% Niveau ( $\chi^2=5,8$ ), Überlebensrate nach 50 Stunden Kallikreingruppe 1, Vergleichsgruppe 4 Tiere.
2. Versuch: Anzahl der Tiere: 33, Kontrollgruppe 16, Kallikreingruppe 17 Tiere. Verbrühungsdauer 22 sec. bei 93°C. Nach 25 Stunden leben von der Kallikreingruppe noch 2 Tiere, von der Vergleichsgruppe 5 Tiere. Da diese Restgruppe zur statistischen Auswertung zu klein ist, wurde der  $\chi^2$ -Test Vergleichsgruppe zu Kallikreingruppe nach der 16. Stunde gemacht. Statistische Sig-

nifikanz nach dem  $\chi^2$ -Test nach der 16. Stunde auf dem 10% Niveau ( $\chi^2=3,8$ ), Überlebensrate nach 50 Stunden 0 bei beiden Gruppen.

3. Versuch : Anzahl der Tiere: 20, Kontrollgruppe 10, Kallikrein-  
gruppe 10 Tiere. Verbrühungsdauer 22 sec. bei  $93^0$  C.  
Nach 25 Stunden leben von der Kallikreingruppe noch  
3 Tiere, von der Vergleichsgruppe 8 Tiere. Statistische  
Signifikanz nach dem  $\chi^2$ -Test signifikant auf dem  
1%-Niveau, dh. hochsignifikant ( $\chi^2=7,3$ ), Überlebensrate  
nach 50 Stunden Vergleichsgruppe 4, Kallikreingruppe  
2 Tiere.

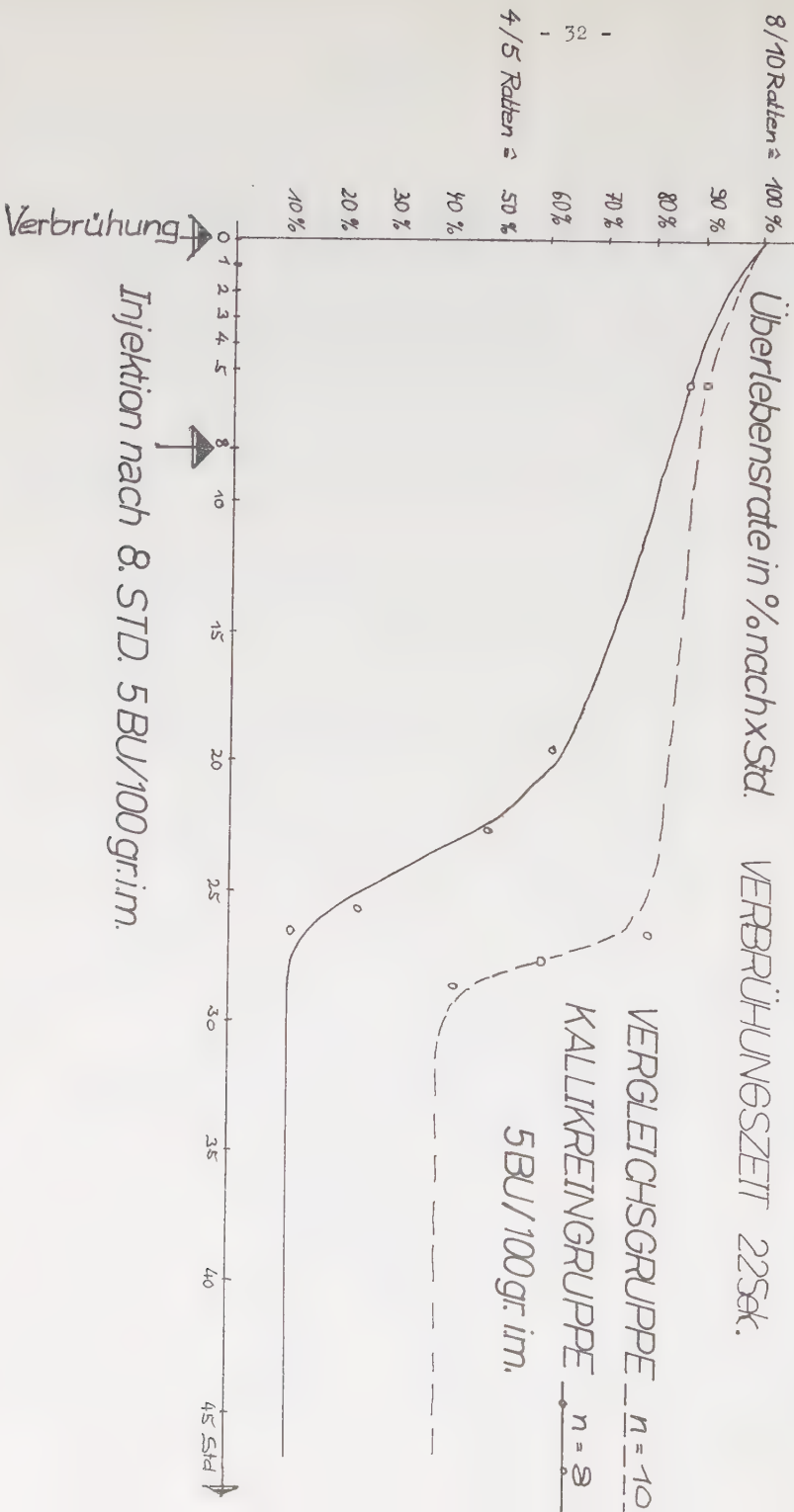
4. Versuch : Anzahl der Tiere: 37, Kontrollgruppe 18, Kallikrein-  
gruppe 19 Tiere. Verbrühungsdauer 35 sec. bei  $93^0$  C.  
Da bei diesem Versuch die Tiere infolge der stärkeren  
Verbrühung schneller starben, wurden die Signifikanzen  
nach der 8. und 13. Stunde berechnet. Nach 8 Stunden  
leben von der Kallikreingruppe 5, von der Vergleichs-  
gruppe 13. Der  $\chi^2$ -Test ist hierbei hochsignifikant auf  
dem 1%-Niveau ( $\chi^2=6,2$ ). Nach 13 Stunden leben von der  
Kallikreingruppe 1, von der Vergleichsgruppe 5 Tiere,  
Überlebensrate nach 50 Stunden Kallikreingruppe 0, Ver-  
gleichsgruppe 3 Tiere.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsserien sind auf den folgenden  
Graphiken und Kurven veranschaulicht.

Graphik 1 - 4 Versuchsaufzeichnung wie oben beschrieben.

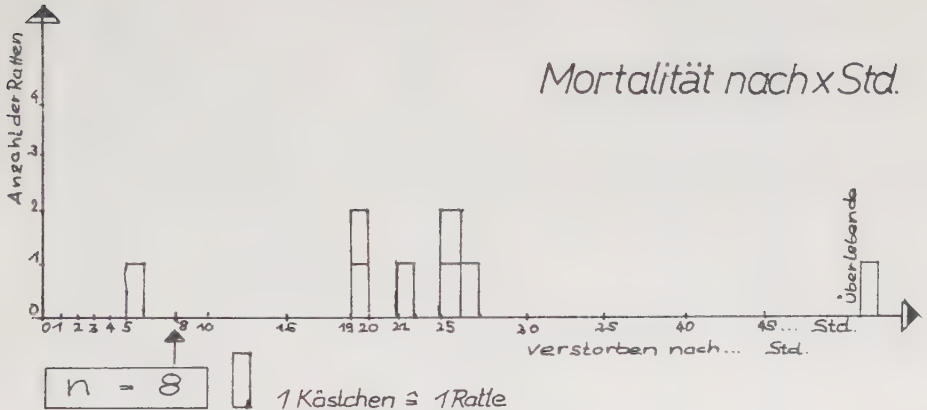
Kurve 1 - 4 Vergleichskurven der Sterberaten ohne und mit  
Kallikreinapplikation.

# 1. HITZESCHOCKVERSUCH - 3.10.73



## 1. HITZESCHOCKVERSUCH - 3.10.73

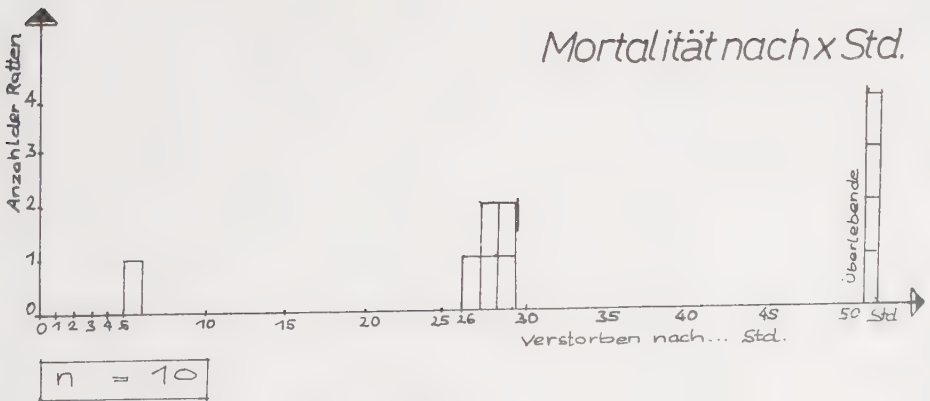
Kallikreingruppe 5 BU/100 gr. i.m.



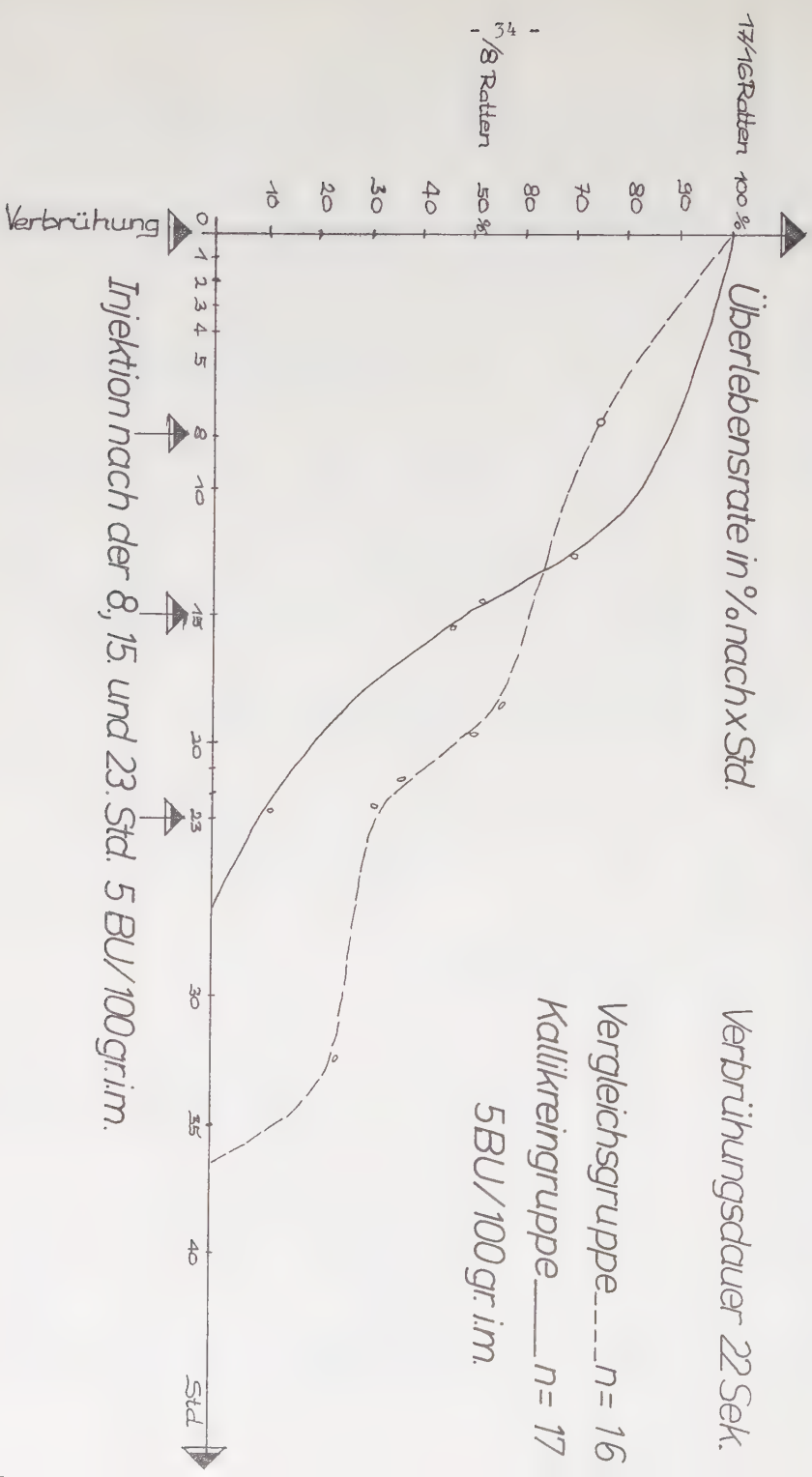
Injektion nach 8. Std. 5 BU/100gr.i.m.

Verbrühungszeit 22 Sek.

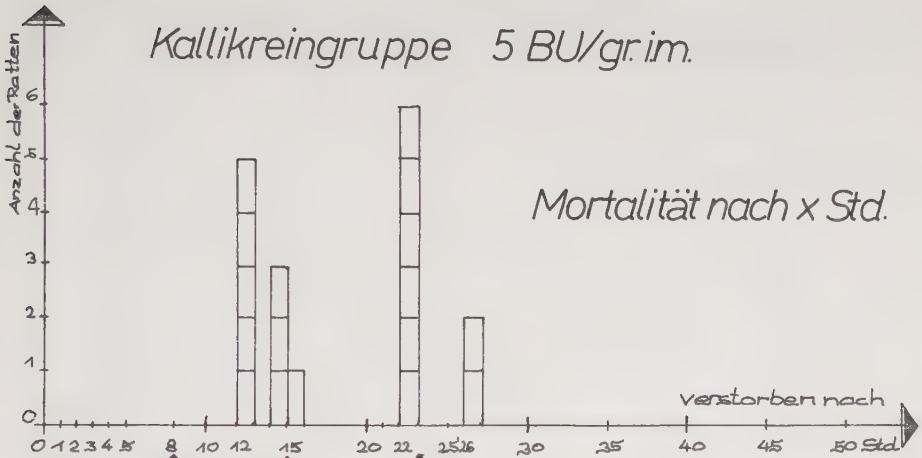
Vergleichsgruppe



## 2. HITZESCHOCKVERSUCH-31.10.73



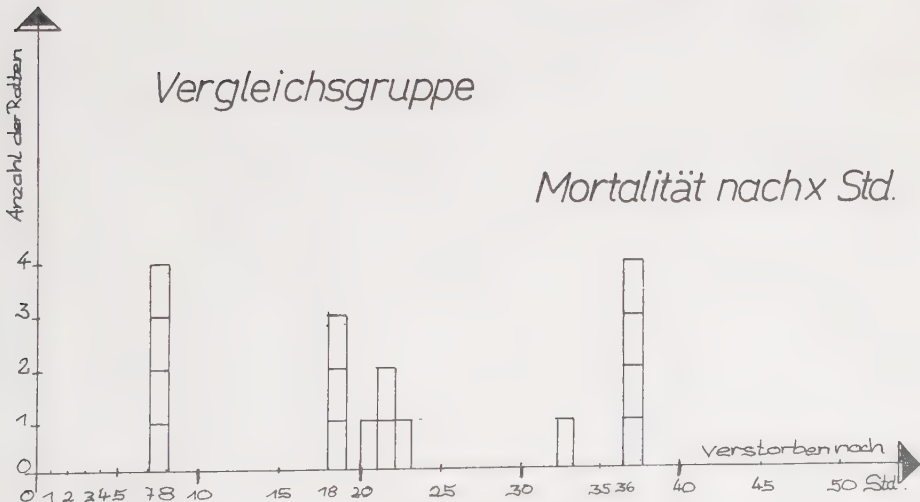
## 2. HITZESCHOCKVERSUCH - 31.10.73



$n = 17$

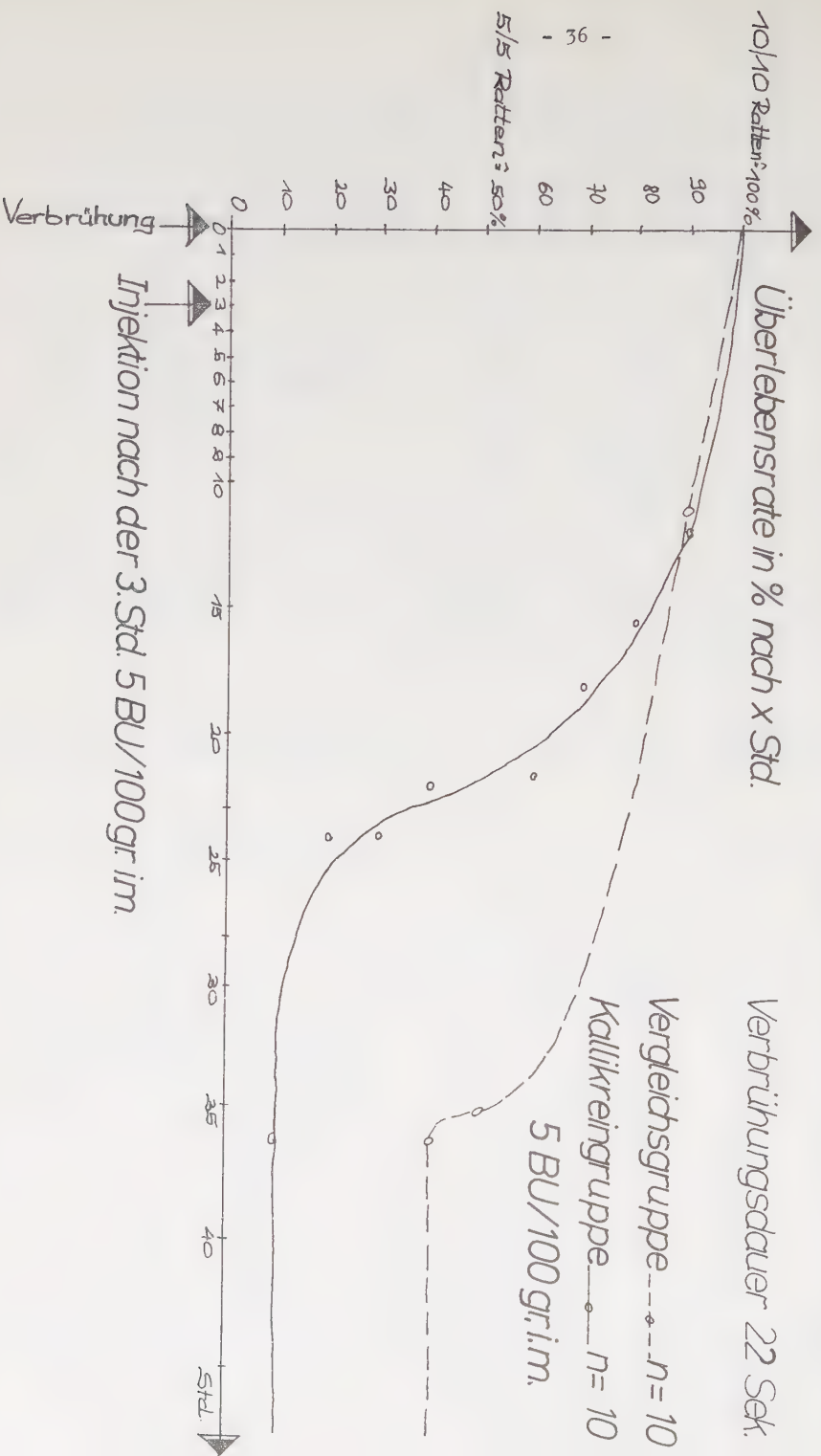
*Injektion nach der 8, 15. und 23. Std. 5 BU/100gr.i.m.*

*Verbrühungsdauer 22 Sek.*



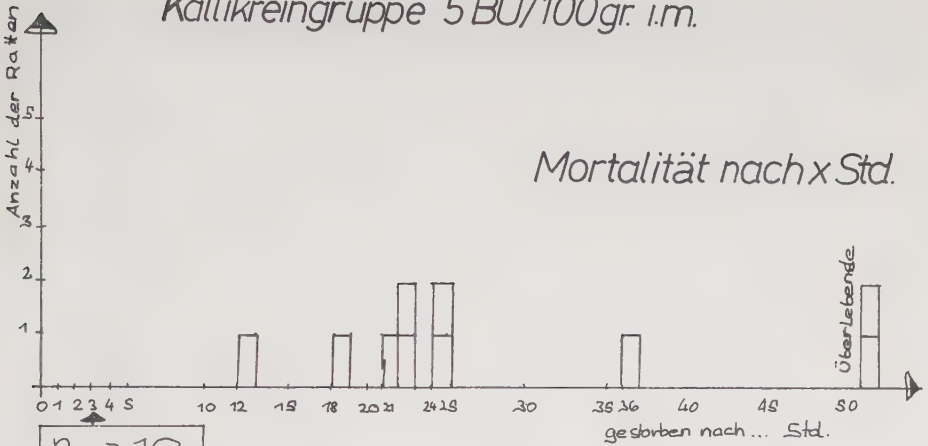
$n = 16$

### 3. HITZESCHOCKVERSUCH-19.11.73



### 3.HITZESCHOCKVERSUCH -19.11.73

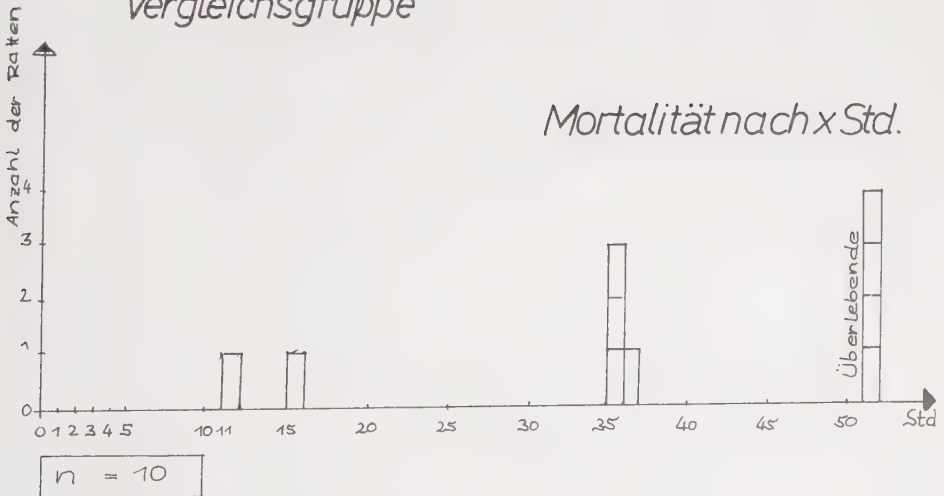
Kallikreingruppe 5 BU/100gr. i.m.



Injektion nach der 3.Std. 5 BU/100gr.i.m.

Verbrühungsdauer 22Sek.

Vergleichsgruppe



# 4. HITZESCHOCKVERSUCH - 7.12.73

19/18 Ratten  $\approx 100\%$

- 38 -

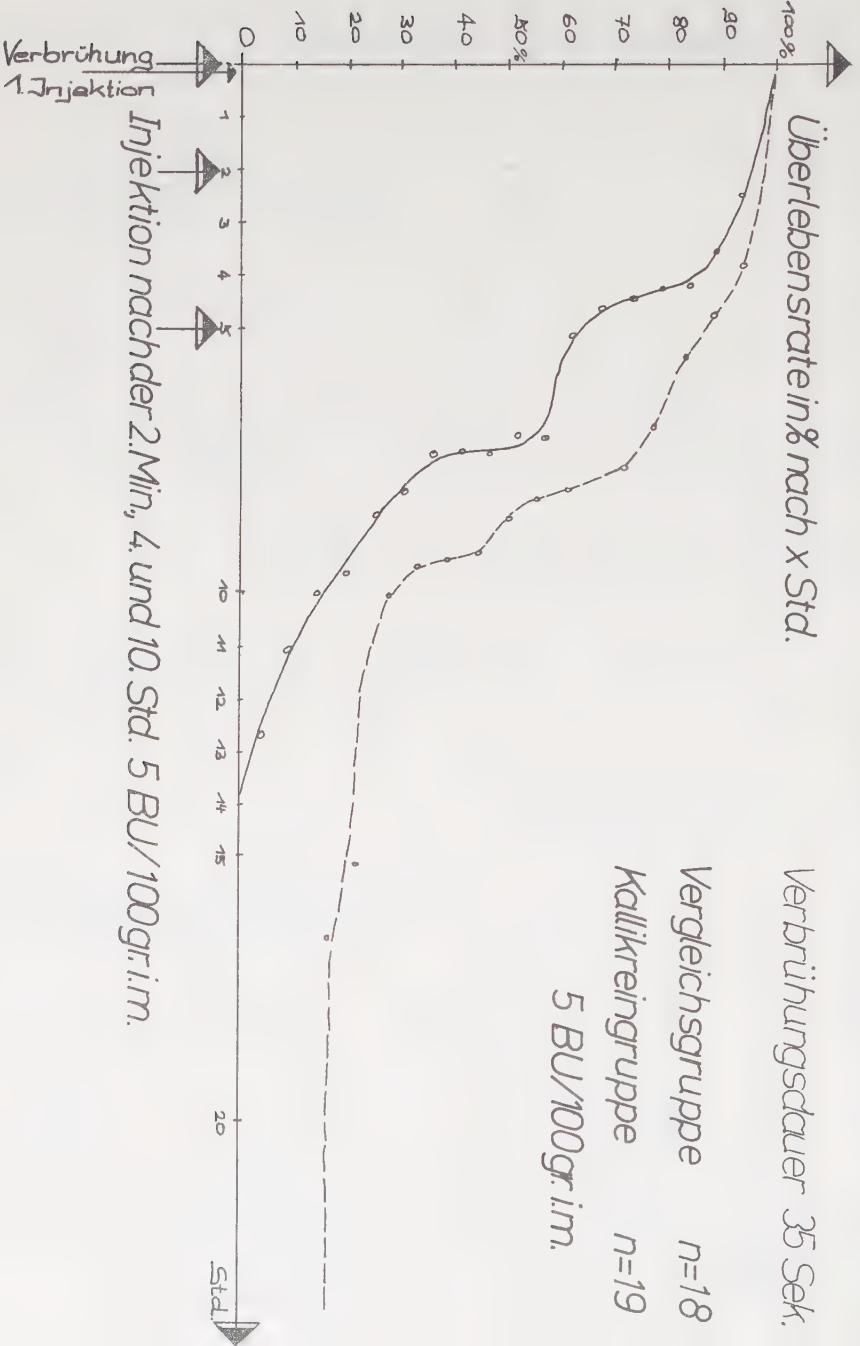
Überlebensrate in % nach x Std.

Verbrühdungsdauer 35 Sek.

Vergleichsgruppe n=18

Kalkkreingruppe n=19

5 BU/100gr.im.

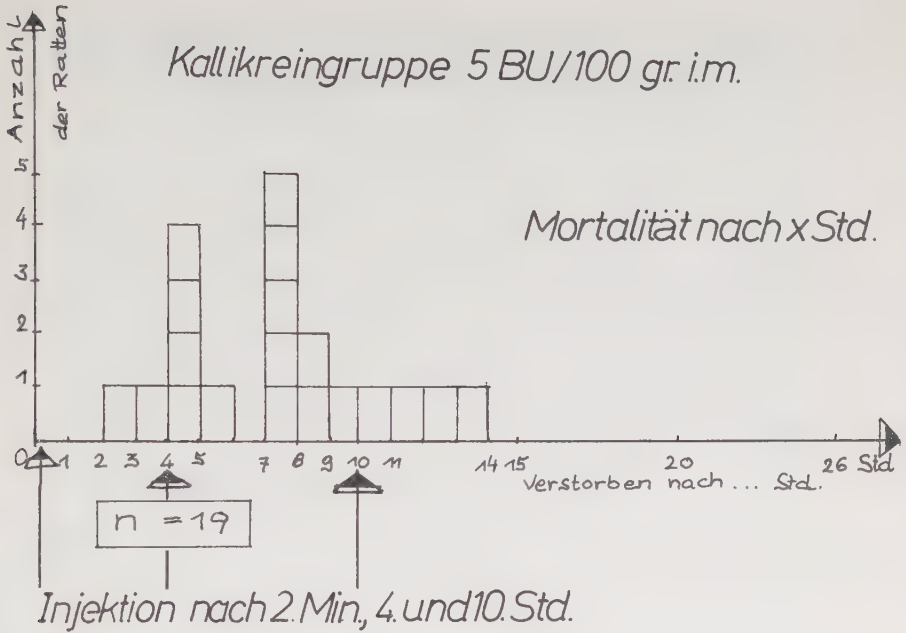


Verbrühdung  
1. Injektion

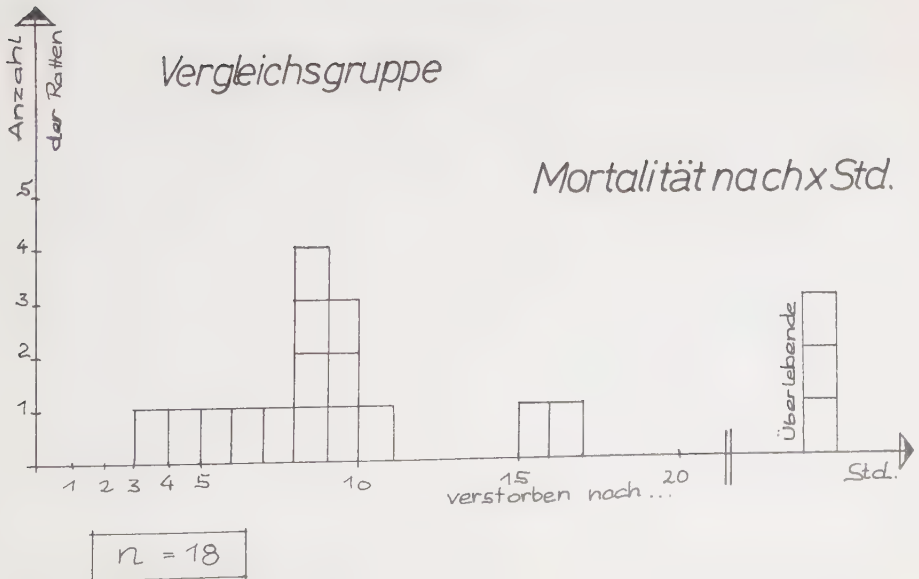
Injektion nach der 2. Min., 4. und 10. Std. 5 BU/100gr.im.

# 4. HITZESCHOCKVERSUCH-712.73

Kallikreingruppe 5 BU/100 gr i.m.



Verbrühungsdauer 35Sek



E : Diskussion der Ergebnisse des Kallikreineinflusses auf die  
Wundheilung und den irreversiblen Verbrühungsschock :

In vielen Veröffentlichungen über das Kallikrein-Kinin-System wurden bisher hauptsächlich die pathophysiologischen Wirkungen dieser Stoffe, die pathologische Vasodilatation, die erhöhte Gefäßpermeabilität und die myokarddepressorische Wirkung erörtert. Die Beteiligung der Kinine im irreversiblen Schock wurde indirekt bewiesen durch die umfangreichen Untersuchungen über die Wirkung von Trasylol<sup>R</sup>, einem polyvalenten Proteasehemmstoff, der auch Kallikrein hemmt und der im Schock eine Irreversibilität des Schockgeschehens verhindern kann. Direkte Untersuchungen des Kininogengehaltes, d.h. des Kallikreinsubstrates, sowie des Präkallikrein- und Kininasegehaltes des Serums nach Gewebsschädigung durch intramuskuläre Injektion von Crotonöl bzw. Essigsäure und nach thermischer Gewebstraumatisierung bzw. nach operativer Wundsetzung von Zach und Werle (88) ergaben, daß es nach Gewebsschädigung, unabhängig von der Art der Schädigung, zu einem Kininogenanstieg kommt, der am 2.-3. Tag nach Gewebstraumatisierung das Maximum erreicht mit Werten um das 2-3fache der Norm, daß die Präkallikrein- und Kininaseaktivität allerdings unverändert bleibt. Der Mechanismus der Kininogensynthesesteigerung ist dabei noch nicht geklärt. Im Hinblick auf diese Untersuchungen wollten wir direkt die Wirkung von Kallikreinapplikation im irreversiblen Schock prüfen. In vier verschiedenen Versuchsreihen applizierten wir Kallikrein zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verbrühung und in

verschiedenhoher Dosierung. Wir fanden dabei, daß Kallikrein bei allen Versuchen die Schockwirkung verstärkt und die Überlebensrate signifikant herabsetzt, wobei allerdings die Kallikreinapplikation unmittelbar nach Gewebstraumatisierung die stärkste Wirkung zeigt. Wir können annehmen, daß das Kallikrein-Kinin-System vor allem die erste Phase des Schockgeschehens entscheidend beeinflusst. Die Kallikreindosis dagegen, falls sie genügend spät nach dem Schockereignis appliziert wird, hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Schockablauf. Bisher wurden hauptsächlich Histamin und Serotonin für die Störung der Mikrozirkulation zu Beginn des Schockgeschehens verantwortlich gemacht.

Neuere Arbeiten von Rixon und Whitfield, sowie Mandel und Rodesch haben eine proliferationsfördernde Wirkung des Kallikreins nachgewiesen. Nach Kallikreinapplikation kommt es nach diesen Untersuchungen zu einer deutlichen Zunahme der Mitoserate, zu einem verstärkten Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin; die Wundheilungen bei Radiodermatitiden wird durch Kallikrein gefördert, die Überlebensrate nach letalen Röntgendosen erhöht. Rohen und Peterhoff untersuchten die Wirkung von Kallikrein auf die Zellproliferation des Darmepithels und fanden nach intraperitonealen Kallikreininjektionen ein deutliches Anwachsen der Mitoserate der Zellen der Duodenal- und Dünndarmschleimhaut. Die Proliferations- und wundheilungsfördernde Wirkung von Kallikrein konnten wir bei unseren Versuchen zur Wundheilung nach Verbrühungswunden bestätigen. Kallikreinapplikationen von 5 BU/100 gr, einer Dosis, die von Rixon, Whitfield, Mandel und Rodesch als voll wirksam gefunden wurde, zeigten auch in unseren Versuchen zur Wundheilung nach Setzung von Verbrühungswunden eine signifikante Beschleunigung der Wundheilung

über alle Zeitabschnitte der Wundheilung. Kallikrein hat also bei der Wundheilung eine fördernde Wirkung wahrscheinlich auf einem zweifachen Wirkungsprinzip: Einmal wird durch die Vasodilatation lokal ein zügigerer Abtransport der Stoffwechselmetaboliten im traumatisierten Bezirk erreicht und zum anderen wirkt Kallikrein auf die nötige Zellproliferation im nekrotischen Gebiet stimulierend und fördert somit die Bildung von Granulationsgewebe.

**F : Zusammenfassung**

---

Ausgehend von neueren Untersuchungen über die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems beim Kreislaufschock und über eine mitose-fördernde Wirkung des Kallikreins und der Kinine untersuchten wir den Einfluß von Kallikrein auf die Wundheilung nach Hautverbrühungen bei Ratten und die Wirkung von zusätzlicher Kallikreingabe im irreversiblen Schock nach Verbrühung bei Ratten.

Dabei fanden wir, daß Kallikrein auf die Wundheilung einen deutlich fördernden Einfluß hat. Die Verbrühungswunden heilten im Durchschnitt bei der Kallikreingruppe in einem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen um 6 Tage schneller bis zum Stadium des Restnarbenstranges der großen Ausgangswundfläche. Wir konnten so die bisher bei Radiodermatitiden beschriebene Wundheilungsförderung bei der Wundheilung nach Verbrühung bestätigen. Wir applizierten dabei täglich 5 BU(biological unit) pro 100g KG intramuskulär. Im gesamten, regelmäßig planimetrisch kontrollierten Beobachtungszeitraum ergaben Mittelwertberechnungen nach dem Students-T-Test signifikant schnellere Wundflächenverkleinerungen bei der Kallikreingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in jedem Abschnitt der Wundkontrollen.

In vier Reihenversuchen wurde der Einfluß von i.m.Kallikreingaben auf die Überlebenszeit tödlich verbrühter Ratten geprüft. Dabei wurden die Kallikrein-Dosis und der Zeitpunkt der Injektionen variiert. Erwartungsgemäß wurde die Überlebensrate am stärksten dann verkürzt, wenn die Kallikreingabe unmittelbar nach der Verbrühung und weiter nach 4 und 10 Stunden verabreicht wurde.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Kallikrein-Kinin-System in dem Geschehen des tödlichen Schocks eine Rolle spielt. Ein strenger Beweis ist das nicht. Er würde erst erbracht sein, wenn Messungen des Spiegels an freiem Kinin nach Verbrühung oder Verbrennung laufend starke Erhöhungen ergäben. Umgekehrt müßte die i. v. Verabreichung von Carboxypeptidase B und Trasylol die Überlebensrate erhöhen, da durch sie das gebildete Kinin zerstört bzw. dessen Bildung verhindert wird. Solche Untersuchungen sind im Gang.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s   :

1. Frey, E. K., H. Kraut: Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharm. 133: 1 (1928).
2. Kraut, H., E. K. Frey, E. Bauer: Über ein neues Kreislaufhormon, II. Mitteilung. - Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 175 : 97(1928).
3. Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle: Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. Hoppe-Seylers Z. physiol.Chem. 189: 97 (1930).
4. Werle, E.: Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Bauchspeicheldrüse und ihres äußeren Sekretes beim Hund. Biochem. Z. 290: 129 (1937).
5. Werle, E., K. Urhahn: Über den Aktivitätszustand des Kallikreins in der Bauchspeicheldrüse. Biochem. Z. 304: 387 (1940).
6. Werle, E., P. von Roden: über das Vorkommen von Kallikrein in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel und über eine blutdrucksteigernde Substanz in der Submaxillarisdüse des Hundes. Biochem.Z. 301: 213 (1936).
7. Werle, E.: Wird veröffentlicht.
8. Werle, E., R. Vogel: Über die Kallikreinausscheidung im Harn nach experimenteller Nierenschädigung. Arch. int. Pharmacodyn. 126: 171 (1960).
9. Seki, T., T. Nakajima, E. G. Erdös: Colon Kallikrein, Its Relation to the Plasma Enzyme. Biochem. Pharmacol.21: 1227 (1972).
10. Zeitlin, I.J.: Rat Intestinal Kallikrein. Advanc. exp. Med. Biol. 21: 289 (1972).
11. Moriwaki, C., M. Schachter: Kininogenase of the Guinea-Pigs Coagulating Gland and the Release of Bradykinin. J. Physiol. 219: 341 (1971).
12. Fritz, H.: Wird veröffentlicht, im Druck.

13. Werle E., Trautschold I., Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse, 10. Aufl., Bd. VI/C, 1966, S. 745.
14. E. K. Frey, H. Kraut, E. Werle, R. Vogel, G. Zickgraf-Rüdel u. I. Trautschold: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke Verlag, Stuttgart (1968).
15. I. Trautschold u. E. Werle, Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.325,48(1961).
16. I. Trautschold, Habilitationsschrift, Med. Fak. München (1965).
17. E. Werle u. B. Kaufmann-Bötsch, Naturwissenschaften 46, 559 (1959).  
E. Werle u. B. Kaufmann-Bötsch, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 52 (1960). E. Habermann, Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 236, 492 (1959).
18. Bhoola, K. D., G. Dorey: Kallikrein, Trypsin-like Proteases and Amylase in Mammalian Submaxillary Glands. Brit. J. Pharmacol. 43: 784 (1971).
19. Margolis, J.: Initiation of Blood Coagulation by Glass and Related Surfaces. J. Physiol. 137: 95 (1957).  
The Mode of Action of Hagemann Factor in the Release of Plasma Kinin.J. Physiol. 151 :238 (1960).
20. Austen, K. F., J. Spragg, A. Schreiber, A. Kaplan: Activation of Components of the Human Plasma Kinin System. Abstracts of Invited Presentation, Vth Int. Cong. Pharmacol., San Francisco July 23-28, 1972, p. 182.
21. Werle, E., P. von Roden: Über das Vorkommen des Kallikreins in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel. Biochem. Z. 286: 213 (1936).
22. Rocha e Silva, M. L. Reis, L. Okino: Comparative Actions of Kinins of Increasing Molecular Weight on Smooth Muscle, Blood Pressure, and Vascular Permeability. Advanc. exp. Med. Biol. 21: 309 (1972).
23. Structure and function of Biologically active peptides: Bradykinin, Kallidin, and Congeners: Ann. N. Y. Acad. of Sciences (1963) Vol104.
24. Brecher, G. A., Brobmann G. F.,: Effect of Kallikrein on the Cardiovascular System, in Handbuch der exp. Pharmakologie, Vol. XXV, pp. 351 - 361. Berlin-Heidelberg-New York: Springer (1970).

25. Werle, E. Stücker, F.: F. Stücker, Inaug.-Diss. Med. Fakultät Univ. München, 1956.
26. Kovalcik, V.: Effect of bradykinin on isolated coronary arteries. *Nature*(Lond). 196, 174 (1962).
27. Konzett, H., Bauer, G.: The action of hypotensive polypeptides on the pulmonary arterial pressure. In: Hypotensive peptides, p. 375, ed. by E. G. Erdös, N. Back, and F. Sicuteri. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
28. Keatinge, W. R.: Electrical and mechanical responses of vascular smooth muscle to vasodilator agents and vasoactive polypeptides. *Circulation Res.* 18, 641 (1966).
29. Felix, J.: An experimental study of the action of padutin. *Acta med. scand.* 83, 1 (1939).
30. Frey, E. K., Werle, E., Sackers, E.: Über die Wirkung intravenöser und intramuskulärer Kallikreininjektionen beim Menschen. *Z. ges. exp. Med.* 96, 404 (1935).
31. Sackers, E.: Über die Wirkung intravenöser und intramuskulärer Kallikreininjektionen. Inaug.-Diss. Düsseldorf 1936.
32. Lorenz, O.: Die Wiederherstellung der Ober- und Unterlippe durch den Nasolabiallappen. *Med. Klin.* 17, 379 (1946).
33. Lindemann, A.: Leitfaden der Chirurgie und Orthopädie der Kiefer und des Mundes. Liefg. 5. Leipzig: J. A. Barth 1947.
- 34.- 38.  
Structure and function of Biologically active peptides: Bradykinin, Kallidin, and Congeners: *Ann. N. Y. Acad. of Sciences* Vol 104, (1963).
39. Boström, H., K. Bernssen, N. W. Withehouse: *Biochem. Pharmacol.* 13: 413 -421 (1964).
40. Brack, W. J., J. Lindner, A. Jasper: *Acta histochem.* 13: 195 - 219 (1962).

41. Lindner J. Untersuchungen am Bindegewebe. Habil.-Schrift Hamburg (1957)
42. Dittrich H., Wundheilungsstörungen. Der Chirurg. 42:289- 295(1971).
43. Lindner, J. K. Grassedyck: Z. klin. Chemie u. klin. Biochemie 9: 68 (1971).
44. Chen, R. W., Postlewait, R. W.: The biochemistry of wound healing. Monogr. surg. Sci. 1, 215 (1964).
45. Giesecking, R.: Mesenchymale Gewebe und ihre Reaktionsformen im elektronenoptischen Bild. Veröff.a. d. morph. Path. H. 72. Stuttgart: Fischer (1966).
46. Perris, A. D., J. F. Whitfield: The mitogenetic action of bradykinin on thymic lymphocytes and its dependence on calcium. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 130: 1198 - 1201 (1969).
47. Rixon, R. H., J. F. Withfield, J. Bayliss: The stimulation of mitotic activity in the thymus and the bone marrow of rats by kallikrein. Horm. Metab. Res. 3 : 279-284 (1971).
48. Withfield, J. F., J. P. MacManus, D. J. Gillan: Cyclic AMP mediation of bradykinin-induced stimulation of mitotic activity and DNA synthesis in thymocytes. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 133: 1270-1274 (1970).
49. Massart A., J. Henry: J. Belg. Radiol., 44: 667 (1961).
50. Massart A., J. Rodesch: Rapp. EUR 125 F, (1962).
51. P. Mandel, J. Rodesch, J. M. Mantz: The treatment of Experimental Radiation Lesions by Kallikrein. Kininogenases Kallikrein, First Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, Intern. Symposium held at the Academy of Science and Literature at Mainz, Nov. 18.and 19. 1972, ed. by G. L. Haberland and J. W. Rohen, Schattauer, Stuttgart- New York (1973).
52. Baraduc, H. A. P.: Des causes de la mort à la suite de Brulures superficielles, des moyens de l'éviter. Paris. (1862).
53. Underhill, F. P.: Changes in blood concentration with special reference to the treatment of extensive superficial burns. Ann. Surg. 86 (1927), 840.

54. Arturson, G.: Pathophysiological aspects of the burn syndrome with special reference to liver injury and alterations of capillary permeability, *Acta chir. scandinav. supp.* 274: 1 (1961).
55. Koslowski, L.: Die Rolle proteolytischer Fermente und die Anwendung von Trasylol bei Verbrennungen, in *Neue Aspekte der Trasyloltherapie*. Bd. 3, G. L. Haberland, P. Matis, Schattauer, Stuttgart-New York (1969).
56. Rocha e Silva, M.: The physiological significance of bradykinin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 104: 190 (1963).
57. Edery, H., G. P. Lewis: Kinin-forming activity and histamine in lymph after tissue injury. *J. Physiol.* 169: 568 (1963).
58. Jacobsen, S., B. A. Waaler: The effect of scalding on the content of kininogen and kininase in limb lymph. *Brit. J. Pharmacol.* 27: 222 (1966).
59. Arturson, G., *Scand. J. clin. Lab. Invest. Suppl.* 107, 153-161, (1969).
60. Artursson, G., M. Hamberg: Prostaglandins in human burn blister fluid. *Acta phys. scand.* 87:270 - 276 (1973).
61. Hamberg, U.: Problems in evaluating the components of the kinin system, *Ann.Chir. et Gyn. Fenn.* 61: 238-250 (1972).
62. Hamberg, U., Elg, P., Stelwagen, P.: On the mechanism of bradykinin potentiation. In: *Pharmacology of hormonal polypeptides and proteins*. Ed. N. Back, L. Martini and R. Paoletti. Plenum Press, New York (1968).
63. Lillehei, R.C., F. Simeone, J. C. Melby, V. J. Collins: Shock - current concepts of pathogenesis and treatment (Symposion). *New Physician* 13: 415 (1964).
64. Crowell, J. W., A. C. Guyton: Evidence favoring a cardiac mechanism in irreversible hemorrhagic shock. *Amer. J. Physiol.* 201: 983 (1961).

65. Masson, W. H.: Role of biologic energy transformation during shock in the development of "irreversibility". *Anesth. Analg.* 48:263(1969).
66. Lefer, A. M.: Role of a myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock. *Fed. Proc.* 29: 1836 (1970).
67. Massion, W. H.; E. G. Erdös: The effect of ATP and a proteolytic enzyme inhibitor in irreversible shock. *J. Okla. med. Ass.* 59: 467 (1966).
68. Meyer, A., E. Werle: In: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas (Heinkel, K., H. Schön Hrsg.) S. 299. Schattauer, Stuttgart (1964).
69. Horton, E. W.: Human Urinary Kinin Excretion. *Brit. J. Pharmacol.* 14: 125 (1959).
70. Erdös, E. G. : Hypotensive peptides: bradykinin, kallidin, and eledoisin. In: *Advanc. Pharmacol.* 4: 1 (1966).
71. Lefer, A. M.: Role of a myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock. *Fed. proc.* 29: 1836 (1970).
72. Lefer, A. M., J. B. Martin: Relationship of plasma peptides to the myocardial depressant factor in hemorrhagic shock in cats. *Circul. Res.* 26.: 56 (1970).
73. Glenn, T. M., A. M. Lefer: Protective effect of thoracic lymph diversion in hemorrhagic shock. *Amer. J. Physiol.* 219: 1305 (1970).
74. Baron, H.: Die Bedeutung des Bindegewebes für die Wundheilung. *Dtsch. Z. Chir.* 261: 483 (1949).
75. Ludwig, H., F. Tauber; Proteinaseinhibition im experimentellen Schock, in *Neue Aspekte der Trasyloltherapie* Bd. 4, G.L. Haberland, p. Huber, P. Matis, Schattauer, Stuttgart- New York (1970).
76. Lorthioir, J., R. Ley, G. Schnells: Untersuchung über die Wirkung des Proteinaseinhibitors Trasylol auf Organschäden beim Verbrennungsschock der Ratte. *Neue Aspekte der Trasyloltherapie* Bd. 5, W. Brendel, G. L. Haberland, Schattauer, Stuttgart-New York (1972).

77. Brooks, J. W., E. J. Evans, W. T. Harm, J. D. Reid!: The influence of external body radiation on mortality from thermal burns. *Ann. Surg.* 136: 535 - 545 (1952).
78. Pears, H. E., H. D. Kingsley: Thermal burns from the atomic bomb. *Surg. Gynec. Obstet.* 98: 385 - 394 (1954).
79. Grisola, A., W. F. Forrest, L. F. Peltier: The treatment of fractures complicatet by burns on experimental study, *J. Trauma*, 3: 259 - 264 (1963).
80. McCarthy, M. D., J. R. Lewis: A standardized back burn procedure for the white rat suitable for the study of the effects of therapeutic and toxic agents on long-term survival. *J. Lab. Clin. Med.* 30: 1027 (1945).
81. Arturson, G.: The infliction and healing of a large Standard burn in rats. *Acta path. et microbiol. scandinav.* 61: 353 -364 (1964).
82. Schildt, B., A. Nilsson: Standardized Burns in Mice. *European Surgical Research* 2: 23-33 (1970).
83. Moritz, A. R., F. C. Henriques: Studies of thermal injury. II The relative importance of time and surface temperature in the causation of cutaneous burns. *Amer. J. Path.* 23: 695-720 (1947).
84. Bailey, B. N., Lewis, S. R., Blocker, T. G.: Standardization of experimental burns in the laboratory rat. *Texas. Rep. Biol. Med.* 20: 20 - 29 (1962).
85. Wiggers, C. J.: Physiology of shock. New York: Commonwealth F. (1950).
86. Lasch, H. G.: Blutgerinnung im Schock. 7. Internat. Kongr. f. Inn. Med. 5.-8. 9. 1962, München, Thieme, Stuttgart 1963. 447 (1963).
87. Habermann, E.: Nachweismethoden und pathophysiologische Bedeutung der Kinine im Schock. *Freiburg*, 30. 10./1. 11. 1969.
88. Zach, H. P., E. Werle: Über den Kininogengehalt von Serum und Plasma nach Gewebsschädigung bei Ratten, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 276, 167-180 (1973).
89. N. Back, H. Wilkens, and R. Steger: Proteinases and Proteinase Inhibitors in Experimental Shock States. *Ann. N.Y. Academy of Sciences* 146, 491 (1968).



Annemarie Berkenheier

München, den 20.1.1974

Lebenslauf :

Geboren am 15. Februar 1919 in München

Eltern : Jakob Berkenheier Dr.med., Allgemeinarzt  
Agnes Berkenheier, geb. Niehaus, Hausfrau

Familienstand : ledig

Ausbildungsweg :

1925 - 1930 Volksschule in München

1930 - 1936 Gymnasium d. Engl. Fräulein in München und Abschluß  
der Mittleren Reife

1943 Abitur am Gymnasium in der Albrechtstraße, nach Unter-  
brechung der Gymnasialzeit.

1943 - 1950 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München mit Staatsexamensabschluß

1952 Approbation

seit 1.9.1955 kassenärztlich zugelassene Allgemeinärztin in München.









